



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

*Márcia Nieves Carneiro da Cunha*

**Produção e Extração de Ácido Clavulânico por *Streptomyces malasyensis*  
DPUA 1571 por Fermentação Convencional e Extrativa Utilizando Sistema  
de Duas Fases Aquosas**

Recife – 2014



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

*Márcia Nieves Carneiro da Cunha*

**Produção e Extração de Ácido Clavulânico por *Streptomyces malasyensis*  
DPUA 1571 por Fermentação Convencional e Extrativa Utilizando Sistema  
de Duas Fases Aquosas**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia – RENORBIO, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de doutor em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia Industrial

Orientador (a): Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Ana Lúcia Figueiredo Porto

Co-orientador (a): Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Tatiana Souza Porto

Ficha catalográfica

C972p Cunha, Márcia Nieves Carneiro da  
Produção e extração de ácido clavulânico por  
*Streptomyces malaysiensis* DPUA 1571 por fermentação  
convencional e extrativa utilizando sistema de duas fases  
aquosas / Márcia Nieves Carneiro da Cunha. – Recife, 2014.  
140 f.: il.

Orientadora: Ana Lúcia Figueiredo Porto.  
Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Rede  
Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), Recife, 2014.  
Ponto focal em Pernambuco - Universidade Federal  
Rural de Pernambuco.  
Inclui referências e anexo(s).

1. Ácido clavulânico 2. Sistema de duas fases aquosas  
3. *Streptomyces malaysiensis* DPUA 1571 4. Fermentação  
extrativa 5. Fermentação convencional 6. Biorreator  
I. Porto, Ana Lúcia Figueiredo, orientadora II. Título

CDD 620.8


MÁRCIA NIEVES CARNEIRO DA CUNHA

**Produção e Extração de Ácido Clavulânico por *Streptomyces malasyensis*  
DPUA 1571 por Fermentação Convencional e Extrativa Utilizando Sistema  
de Duas Fases Aquosas**

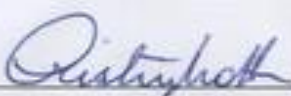
Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia - Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO) para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

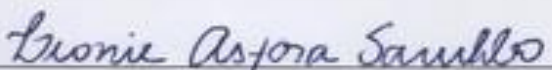
Área de Concentração: Biotecnologia Industrial

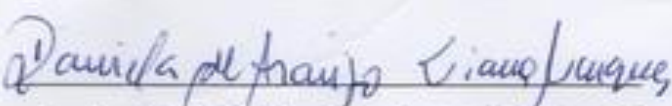
Aprovada em 30 de março de 2014 por:


  
\_\_\_\_\_  
Profª Drª Ana Lúcia Figueiredo Porto

Universidade Federal Rural de Pernambuco - Presidente

  
\_\_\_\_\_  
1º Examinador: Profª Drª Cristina Maria de Souza Motta  
Universidade Federal de Pernambuco - Membro Titular

  
\_\_\_\_\_  
2º Examinador: Profª Drª Leonie Asfora Sarubbo  
Universidade Católica de Pernambuco - Membro Titular

  
\_\_\_\_\_  
3º Examinador: Profª Drª Daniela de Araújo Viana Marques  
Universidade Federal Rural de Pernambuco – Membro Titular

  
\_\_\_\_\_  
4º Examinador: Profª Drª Camila Souza Porto  
Universidade Federal Rural de Pernambuco – Membro Titular

*Dedico*

*"Aos meus pais Maria das Neves e José Francisco, pelo amor, carinho e incentivo que me deram durante todos esses anos de estudo. A vocês que se doaram inteiros e que muitas vezes renunciaram seus sonhos para que eu pudesse realizar os meus sonhos... Não bastaria um muito obrigada.*

*E ao meu companheiro João Thyago, pelo amor e incentivo, e por estar sempre presente nos momentos mais difíceis desta caminhada."*

*"Uma mágoa não é motivo para outra mágoa.  
Uma lágrima não é motivo para outra lágrima.  
Uma dor não é motivo para outra dor.  
Só o riso, o amor e o prazer merecem revanche.  
O resto, mais que perda de tempo...  
É perda de vida".*

*Francisco Cândido Xavier*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, que ilumina meus dias, por ter me dado força nos momentos de fraqueza, calma nos momentos de desespero, saúde, sabedoria e conforto para a execução deste trabalho.

A minha família, meu alicerce, pela paciência, atenção e amor dedicados a mim, sem os quais seria impossível chegar onde estou.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ana Lúcia Figueiredo Porto, pela excelente orientação, apoio e incentivo dedicados, por ter me proporcionado a oportunidade de ingressar na pesquisa científica. Declaro aqui minha grande admiração e agradeço pela confiança ofertada.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Tatiana Souza Porto, minha co-orientadora neste trabalho, agradeço pelo apoio, carinho e amizade dedicados, e por todos os valiosos ensinamentos ao longo de todo o processo.

À Dr<sup>a</sup> Camila Souza Porto, informalmente chamada por mim de “*co co-orientadora*”, pelo incansável companheirismo e colaboração, mas principalmente pela amizade ofertada.

Ao Dr. André Mota, dedicado pesquisador, agradeço pelo profissionalismo, ajuda e paciência e pelas sugestões oportunas que acrescentaram muito ao trabalho.

A Dr<sup>a</sup> Daniela de Araújo Viana Marques, com quem muito aprendi sobre ácido clavulânico, muito obrigada!

As Dr<sup>as</sup> Pollyanna Nunes e Cynthia Oliveira e ao Dr. Romero Brandão pela disponibilidade em ajudar sempre.

As Profa. Dra. Maria Francisca Simas por ceder o micro-organismos utilizados neste estudo.

A todos os queridos amigos que formam a família LABTECBIO, agradeço pelo convívio alegre e descontraído e por todas as experiências compartilhadas.

Aos amigos Késsia Porfírio, Thais Tineé, Tiago Pajeú, Juanize Matias, Amanda Sales, Patyanne Correia, Ellen Leal e Vanessa Régia, mais que companheiros de bancadas, verdadeiros amigos que tive a honra encontrar neste caminho. Agradeço a Deus por ter vocês em minha vida.

As alunas de iniciação científica, Késsia Porfírio e Thais Tineé, que tanto contribuíram para a execução deste trabalho, muito obrigada pela amizade e companheirismo de sempre.

Aos amigos da graduação, em especial a amiga Maria Juliana Dantas, grande incentivadora;

A técnica Iêda Cabral, pelo apoio técnico no andamento deste trabalho;

Aos colegas de Pós-Graduação pelos momentos de estudo e dedicação durante a obtenção dos créditos.

Aos professores da Pós-Graduação, pela ajuda e conhecimentos repassados ao longo do curso de Doutorado em Biotecnologia – RENORBIO.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia - RENORBIO e aos secretários Paulo e Sandra pelo apoio.

Aos órgãos de fomento CAPES e CNPq pelo suporte financeiro para o desenvolvimento deste trabalho através da concessão de bolsas de estudo.

A todos, sem exceção, que de alguma forma contribuíram para a realização deste sonho, meus mais sinceros agradecimentos.



## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS .....	viii
LISTA DE FIGURAS .....	v
LISTA DE TABELAS .....	viii
ABREVIACÕES .....	x
RESUMO .....	xii
ABSTRACT .....	xiii
1.0 INTRODUÇÃO .....	14
2.0 OBJETIVOS.....	16
2.1- Objetivo geral .....	16
2.2- Objetivos específicos .....	16
Capítulo I – Revisão de Literatura .....	18
I.2 Antibióticos $\beta$ -lactâmicos.....	23
I.2.2 Mecanismo de ação dos antibióticos $\beta$ -lactâmicos.....	27
I.3 Resistência Bacteriana e Produção de $\beta$ -lactamases .....	29
I.4 Inibidores de $\beta$ -lactamases .....	33
I.5 Ácido Clavulânico (AC).....	34
I.5.1 Biossíntese do Ácido Clavulânico .....	36
I.5.3 Estabilidade do Ácido Clavulânico .....	41
I.5.4 Extração e Purificação do Ácido Clavulânico .....	42
I.6 Extração líquido-líquido em sistema de duas fases aquosas (SDFA).....	43
I.7 Fermentação extrativa utilizando sistema de duas fases aquosas.....	49
I.7 REFERÊNCIAS .....	52
Capítulo II – STABILITY OF CLAVULANIC ACID IN PEG/CITRATE AND LIQUID-LIQUID EXTRACTION IN AQUEOUS TWO-PHASE SYSTEM .....	65
ABSTRACT .....	67
1.0 INTRODUCTION.....	67
2.0 MATERIALS AND METHODS .....	69
2.1 Materials .....	69
2.2 Clavulanic Acid stability in PEG and Citrate salt solutions .....	69
2.3 Clavulanic Acid extraction in aqueous two-phase system (ATPS) PEG/Citrate .....	70
2.4 Clavulanic acid assay.....	71
2.5 Calculation of partition coefficient ( <i>K</i> ), yield ( <i>Y</i> ) and mass balance ( <i>MB</i> ) .....	71

3.0 RESULTS AND DISCUSSION .....	72
3.1.1 Clavulanic acid stability in sodium citrate .....	72
3.1.2 Clavulanic acid stability in PEG .....	73
3.2 Clavulanic acid partition in Aqueous Two Phase Systems PEG/citrate.....	75
<b>4.0 CONCLUSIONS.....</b>	<b>78</b>
ACKNOWLEDGMENTS .....	79
NOMENCLATURE.....	79
REFERENCES.....	80
Capítulo III – INTEGRATED PROCESS PRODUCTION AND EXTRACTION OF THE CLAVULANIC ACID FROM <i>Streptomyces malaysiensis</i> DPUA 1571 USING AQUEOUS TWO-PHASE SYSTEM.....	90
ABSTRACT .....	92
1.0 INTRODUCTION.....	92
2.0 MATERIAL AND METHODS .....	94
2.1 Reagents.....	94
2.2 Microorganism.....	94
2.3 Cultivation Conditions.....	94
2.4 Production of Clavulanic Acid .....	95
2.5 Production and integrated extraction of clavulanic acid.....	95
2.6 Determination of the clavulanic acid concentration .....	96
2.7 Determination of Cell Concentration.....	96
2.8 Methodology for the analysis of results.....	96
3.0 RESULTS AND DISCUSSION .....	97
3.1 Production of Clavulanic Acid (CA) .....	97
3.2 Extractive Fermentation of Clavulanic Acid .....	99
4.0 CONCLUSION .....	102
ACKNOWLEDGMENTS.....	102
REFERENCES.....	103
Capítulo IV – PRODUÇÃO EM BIORREATOR DE ÁCIDO CLAVULÂNICO POR <i>Streptomyces malasyensis</i> DPUA 1571 .....	112
RESUMO .....	114
1.0 INTRODUÇÃO .....	114
2.0 MATERIAL E MÉTODOS .....	116
2.1 Reagentes.....	116
2.2 Manutenção e reativação do micro-organismo.....	116
2.3 Produção de ácido clavulânico .....	117

2.4 Dosagem do ácido clavulânico .....	118
2.5 Dosagem do glicerol residual .....	118
2.6 Determinação da concentração celular .....	118
3.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	118
4.0 CONCLUSÃO .....	124
AGRADECIMENTOS.....	125
REFERENCIAS .....	125
CONCLUSÕES.....	128
PERSPECTIVAS FUTURAS:.....	130

## LISTA DE FIGURAS

### CAPITULO I – REVISÃO DE LITERATURA

- Figura I.1** - Imagem ilustrativa de *Streptomyces* sp. 22
- Figura I.2** - Ciclo de vida dos *Streptomyces*. (A) Esporo; (B) Micélio vegetativo; (C) Micélio aéreo; (D) Esporulação. 23
- Figura I.3** - Mecanismos de resistência apresentados por bactérias (Tortora, 2012). 32
- Figura 1.4** - Mecanismo de hidrólise de antibiótico  $\beta$ -lactâmico por serino- $\beta$ -lactamases (Silva e Lincopan, 2012). 33
- Figura 1.5** - Estrutura química dos principais inibidores de  $\beta$ -lactamases (adaptado de Williams, 1999). 34
- Figura 1.6** - Estrutura química do Ácido Clavulânico. 36
- Figura 1.7**- Mecanismo de ação do ácido clavulânico (Oliveira et al., 2008). 37
- Figura 1.8** - Biossíntese do Ácido Clavulânico (Oliveira et al., 2008). Onde:  $\beta$ -LS=beta lactam sintase; CAS= Clavaminato sintase; PAH= Proclavamínico Aminidino Hidrolase; CAR= Clavaldeído redutase ou CAD= ácido clavulânico desidrogenase. 39
- Figura 1.9** - Esquema da purificação de um produto de interesse utilizando sistema de duas fases aquosas (SDFA) (Adaptado de Benavides et al., 2008). 45
- Figura 1.10** - Representação geral de um diagrama de fases de um SDFA. (Adaptado de Raja et al., 2011). 46

### CAPITULO II - Degradation and Liquid-liquid Extraction of Clavulanic Acid in Aqueous Two-phase System PEG/citrate

**Figure 2.1** - Clavulanic acid degradation. (A) PEG solutions with molar mass 400 g.mol<sup>-1</sup>, (B) PEG solutions with molar mass 1.000 g.mol<sup>-1</sup>, (C) PEG solutions with molar mass 20.000 g.mol<sup>-1</sup>, (D) citrate solutions with concentration 5% and (E) citrate solutions with concentration 20% in values of pH ranging from 4.0 to 8.0. Where: (◇) pH 4.0; (□) pH 5.0; (Δ) pH 6.0; (■) pH 7.0 and (▲) pH 8. 86

**Figure 2.2** - Pareto chart of main effects, and the response variable partition coefficient of clavulanic acid. 87

**Figure 2.3** - Pareto chart of main effects, and the response variable clavulanic acid yield in the PEG phase. 88

**Figure 2.4**- Graphic representation of clavulanic acid yield in the PEG phase in relation to the concentration of citrate and PEG. 89

### **Capítulo III - Integrated Process Production and Extraction of the Clavulanic Acid from *Streptomyces malaysiensis* DPUA 1571 using aqueous two-phase system**

**Figure 3.1.** Clavulanic acid production from *Streptomyces malasyensis* DPUA 1571. 109

**Figure 3.2.** Pareto chart of the main effects of the independent variables: PEG molar mass (MPEG), PEG concentration (CPEG) and citrate concentration (CCIT), to the partition coefficient (K). 110

**Figure 3.3.** Pareto chart of the main effects of the independent variables: molar mass of PEG (MPEG), PEG concentration (CPEG) and citrate concentration (CCIT) to the yield (Y). 111

### **Capítulo IV - Produção de Ácido Clavulânico por *Streptomyces malasyensis* DPUA 1571 em biorreator**

**Figura 4.1.** Gráfico de Pareto da influência das variáveis agitação (1), temperatura (2) e concentração de glicerol (3) na produção de AC por *Streptomyces malaysiensis* DPUA 1571 em biorreator. 117

**Figura 4.1** Produção de ácido clavulânico e consumo do glicerol presente no meio de cultivo por *Streptomyces malaysiensis* DPUA 1571 em função do tempo. 121

## LISTA DE TABELAS

### CAPITULO I – REVISÃO DE LITERATURA

- Tabela I.1** - Agentes antimicrobianos produzidos pelo gênero *Streptomyces*. 24
- Tabela I.2** - Divisão dos grupos de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos de acordo com a estrutura química. (Dias, 2009). 25
- Tabela I.3** Produtos de interesse biotecnológico produzidos e extraídos simultaneamente por Fermentação Extrativa. 52

### CAPITULO II - Degradation and Liquid-liquid Extraction of Clavulanic Acid in Aqueous Two-phase System PEG/citrate

- Table 2.1** - Levels of independent variables in the  $2^2$  factorial design for CA extraction in aqueous two-phase system (ATPS) PEG/Citrate 82
- Table 2.2** - Influence of independent variables PEG concentration and citrate salts concentration on CA concentrations in top and bottom phases, partition coefficient (CP), yield (Y) and mass balance (BM) according to the  $2^2$  factorial design. 83

### Capítulo III– Integrated Process Production and Extraction of the Clavulanic Acid from *Streptomyces malaysiensis* DPUA 1571 using aqueous two-phase system

- Table 3.1** - Levels of independent variables in the  $2^3$  factorial design for clavulanic acid production and extraction in extractive fermentation. 106

**Table 3.2** - Influence of independent variables PEG Molar Mass, PEG concentration and citrate concentration on CA concentrations, partition coefficient (K) and yield (Y) according to the  $2^3$  factorial designs, after 120 hours of cultivation in extractive fermentation. 107

**Capítulo IV - Produção de Ácido Clavulânico por *Streptomyces malasyensis* DPUA 1571 em biorreator**

**Tabela 1** - Níveis dos fatores utilizados no planejamento fatorial  $2^3$  116

**Tabela 2** - Resultados do planejamento fatorial  $2^3$  para a produção AC por *Streptomyces malasyensis* DPUA 1571 após 120 horas de cultivo. 117



## ABREVIACOES

<b>AC</b>	Ácido clavulânico
<b>CA</b>	<i>Clavulanic acid</i>
<b>PBP</b>	<i>Penicilin Binding Proteins</i>
<b>DAP</b>	Ácido diamilnopimélico
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiaminotetracético
<b>CEA</b>	N2-(2-carboxietil)-arginina
<b>DGPC</b>	Ácido desoxiguanidino proclamínico
<b><math>\beta</math>-LS</b>	$\beta$ -lactam sintase
<b>CAS</b>	Clavaminato sintase
<b>PAH</b>	Proclavamínico Aminidino Hidrolase
<b>CAR</b>	Clavaldeído redutase
<b>CAD</b>	Ácido clavulânico desidrogenase
<b>S DFA</b>	Sistemas de duas fases aquosas
<b>PEG</b>	Polietileno Glicol
<b>TLL</b>	<i>Tie line</i>
<b>rTLL</b>	Volume das fases
<b>Pc</b>	Ponto crítico
<b>EOPO</b>	Copolímeros de óxido de propileno
<b>HPS</b>	Amido hidroxilpropil
<b>IAA</b>	Ácido iminoadiacético
<b>K</b>	degradation rate constant
<b>C<sub>T</sub></b>	Concentration top phase
<b>C<sub>B</sub></b>	Concentration bottom phase

<b>Y</b>	Yield
<b>V<sub>T</sub></b>	Volume top phase
<b>V<sub>B</sub></b>	Volume bottom phase
<b>C<sub>i</sub></b>	Concentration initial
<b>V<sub>i</sub></b>	Volume initial
<b>MB</b>	Mass balance
<b>C<sub>PEG</sub></b>	Concentration PEG phase
<b>C<sub>cit</sub></b>	Concentration citrate phase
<b>Y<sub>PEG</sub></b>	Yield PEG phase
<b>Y<sub>SALT</sub></b>	Yield salt phase

## RESUMO

O ácido clavulânico é um antibiótico  $\beta$ -lactâmico, constituído por um anel  $\beta$ -lactâmico condensado a um anel oxazolidina. Este composto é utilizado clinicamente em combinações com antibióticos  $\beta$ -lactâmicos convencionais. No presente trabalho foi avaliada a produção e extração simultânea de ácido clavulânico por *Streptomyces malasyensis* DPUA 1571 através de fermentação extrativa utilizando Sistemas de Duas Fases Aquosas (SDFA). Inicialmente foi realizado um estudo da estabilidade do ácido clavulânico comercial em soluções de Polietilenoglicol (PEG) e soluções de citrato em diferentes concentrações, e a extração deste composto por SDFA compostos por PEG/citrato. Na etapa seguinte do presente trabalho foi realizada a produção do ácido clavulânico por *Streptomyces malasyensis* DPUA 1571 por fermentação convencional, visando verificar a capacidade deste micro-organismo em produzir ácido clavulânico, e os resultados obtidos viabilizaram a realização da produção e extração integradas do ácido clavulânico utilizando fermentação extrativa em SDFA formados por PEG/citrato. Posteriormente, verificou-se a influência de diferentes variáveis na produção de ácido clavulânico por *Streptomyces malasyensis* DPUA 1571 em biorreator. Os estudos sobre a degradação do ácido clavulânico demonstraram que este é mais estável em PEG 20.000 g/mol, a pH 6. Devido aos resultados obtidos os SDFA utilizados para a partição do ácido clavulânico foram realizados utilizando PEG com massa molar 20.000 g/mol. O ácido clavulânico foi detectado na fase rica em PEG com concentração de 30%, sendo obtido 188,83 mg/L de ácido clavulânico, com coeficiente de partição de  $K=3,46$  e com recuperação igual a  $Y=139,22\%$ . *Streptomyces malasyensis* DPUA 1571 foi capaz de produzir ácido clavulânico, sendo esta produção de 387.66 mg/L após 72 horas de cultivo, e a produção por fermentação extrativa foi viabilizada. Neste processo a maior concentração de ácido clavulânico ( $337,8 \text{ mg.L}^{-1}$ ) foi obtida na fase rica em PEG, quando foram utilizadas as maiores concentrações de PEG e citrato (25%). Valores de coeficiente de partição de 1,6 e rendimentos de até 98,2% foram obtidos. Em uma terceira etapa deste trabalho, foi realizada a produção do ácido clavulânico por *Streptomyces malasyensis* DPUA 1571 em biorreator de bancada (2.0L). Após 120 horas de cultivo foi observada alta concentração de ácido clavulânico (2241,38 mg/L). Resultados que permitem concluir que *Streptomyces malasyensis* DPUA 1571 é uma promissora fonte de ácido clavulânico com potencial para aplicação na área farmacêutica.

**Palavras chave:** ácido clavulânico, SDFA, *Streptomyces malasyensis* DPUA 1571, fermentação extrativa

## ABSTRACT

Clavulanic acid is a  $\beta$ -lactam antibiotic, consisting of a  $\beta$ -lactam ring fused to oxazolidine ring. This compound is used clinically in combination with conventional  $\beta$ -lactam antibiotics. The present study evaluated the simultaneous extraction and production of clavulanic acid by *Streptomyces malasyensis* DPUA 1571 by extractive fermentation using Aqueous Two-Phase Systems (ATPS). Initially, a study of the stability of commercial clavulanic acid in polyethylene glycol (PEG) and citrate solutions at different concentrations and extraction of this compound in ATPS composed of PEG/citrate realized. In the following stage of the present work clavulanic acid production by *Streptomyces malasyensis* DPUA 1571 by conventional fermentation was performed in order to verify the ability of this microorganism to produce clavulanic acid, and the results obtained made it possible to realization of integrated production and extraction of clavulanic acid using extractive fermentation in ATPS formed by PEG / citrate. Later, there was the influence of different variables in the production of clavulanic acid by *Streptomyces malasyensis* DPUA 1571 in bioreactor. Studies on the degradation of the clavulanic acid have shown that it is more stable in PEG 20.000 g/mol, pH 6. Due to the results obtained ATPS used partition of clavulanic acid was performed using PEG molar mass 20.000 g/mol. The clavulanic acid was detected in the PEG-rich phase with a concentration of 30% was obtained 188.83 mg/L of clavulanic acid with coefficient  $K = 3.46$  and partition recovery equal to  $Y = 139.22\%$ . *Streptomyces malasyensis* DPUA 1571 was capable to produce clavulanic acid, and this production of 387.66 mg/L after 72 hours of cultivation, and production was made possible by extractive fermentation. In this process, the largest concentration of clavulanic acid (337.8 mg.L) was obtained from the PEG-rich phase, were used when higher concentrations of citrate and PEG (25%). Values of partition coefficient of 1.6 and yields of up to 98.2%. In a third step of this work, the production of clavulanic acid by *Streptomyces malasyensis* DPUA 1571 was performed in bioreactor bench (2.0L). After 120 hours of culture, higher high concentration of clavulanic acid (2241.38 mg/L) were observed. Results concluding that *Streptomyces malasyensis* DPUA 1571 is a promising source of clavulanic acid with potential for application in the pharmaceutical area.

**Key words:** clavulanic acid, ATPS, *Streptomyces malasyensis* DPUA 1571, extractive fermentation.

## 1.0 INTRODUÇÃO

O principal mecanismo de resistência exibido por uma variedade de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas é a sua habilidade de produzir  $\beta$ -lactamases, enzimas que hidrolisam o anel  $\beta$ -lactâmico dos antibióticos tornando-os inativos (CANTON et al., 2008). Os inibidores de  $\beta$ -lactamases vêm sendo utilizados na clínica médica como uma alternativa para contornar o problema da produção de  $\beta$ -lactamases por bactérias. São utilizados três inibidores de  $\beta$ -lactamases, o ácido clavulânico, o sulbactam e o tazobactam. Atividade inibidora de enzimas  $\beta$ -lactamases do ácido clavulânico é quase cinco vezes maior que o tazobactam e cerca de 600 vezes maior que o sulbactam (PAYNE et al., 1994).

Clinicamente o AC é administrado em conjunto com outros antibióticos  $\beta$ -lactâmicos sensíveis as  $\beta$ -lactamases, e desta forma, protege esses antibióticos contra a hidrólise do anel de  $\beta$ -lactâmico pelas enzimas  $\beta$ -lactamases, tornando-os eficazes contra infecções provocadas por bactérias produtoras de  $\beta$ -lactamase (Bersanatti et al., 2005).

Industrialmente, o AC é produzido por fermentação de *Streptomyces clavuligerus* e seu processo de isolamento e purificação, é um processo relativamente complexo. Tradicionalmente, o primeiro passo da purificação consiste na clarificação por meio de filtração ou centrifugação, seguido de adsorção e de extração líquido-líquido com solventes orgânicos e mais uma purificação por meio de cromatografia de troca iônica ou de outras técnicas de cromatografia (Videira e Aires-Barros, 1994; Pereira et al., 2012). No entanto, vale ressaltar que o AC é uma molécula muito instável com elevada velocidade de degradação, o que dificulta seu processo de isolamento e purificação. Sua baixa estabilidade em soluções aquosas diminui o rendimento durante as etapas de purificação. Assim, o desenvolvimento de processos de separação e purificação mais eficiente e de baixo custo é essencial para melhorar a eficiência

do processo e da economia, mantendo os elevados padrões de qualidade exigidos para a aprovação do mercado (Oliveira et al., 2009).

A partição em sistema de duas fases aquosas (SDFA) é um método usado para purificação de biomoléculas. Uma das características importantes dos sistemas de duas fases aquosas é sua elevada composição em água (cerca de 85-99%), o que permite a partição de biomoléculas e de partículas celulares em condições não desnaturantes (Albertsson, 1986). Os SDFAs são formados por compostos hidrofílicos, tais como alguns tipos de polímeros (polietileno-glicol, dextrana, poli-propileno-glicol, etc) e sais (fosfatos, sulfatos, citratos, etc). Estes compostos, quando combinados em certas concentrações críticas, levam à formação de duas fases aquosas (Benavides et al., 2008).

Os Sistemas de Duas Fases Aquosas (SDFA) têm sido alvo de estudo por ser um método alternativo para a purificação do AC. Alguns autores já estudam a partição de AC em SDFA formados por polietileno-glicol (PEG) e sais fosfato (Videira e Aires-Barros, 1994; Silva et al., 2011). No entanto, SDFA formados por PEG/citrato ainda não foram utilizados para a purificação deste inibidor. Desta forma, este trabalho teve como o objetivo estudar o perfil de estabilidade do ácido clavulânico em soluções de PEG e citrato e estudar a partição desta molécula em sistemas de duas fases aquosas formados por PEG/Citrato. Assim como, produzir e extrair ácido clavulânico por *Streptomyces malaysiensis* DPUA 1571 por fermentação convencional e extrativa.

## 2.0 OBJETIVOS

### 2.1- Objetivo geral

- Produzir e extrair ácido clavulânico por *Streptomyces malasyensis* DPUA 1571 pelo processo de fermentação convencional e extrativa em SDFA (PEG/fosfato) em frascos agitados e em biorreator.

### III. 2- Objetivos específicos

- Avaliar a estabilidade do ácido clavulânico em soluções de Polietilenoglicol (PEG) e soluções de citrato em diferentes concentrações e valores de pH, visando obter as melhores condições para a sua purificação.
- Extrair o ácido clavulânico por sistema de duas fases aquosas formados por PEG/citrato, avaliando a influência da concentração do citrato e do polímero na partição e recuperação deste antibiótico.
- Produzir ácido clavulânico por *Streptomyces malaysiensis* DPUA 1571 por fermentação convencional.
- Produzir ácido clavulânico por *Streptomyces malaysiensis* DPUA 1571 por fermentação extrativa em SDFA formados por PEG/citrato, estudando as variáveis de extração em frascos agitados (Massa molar do PEG [MPEG], concentração do PEG [CPEG], concentração do citrato [Ccit], tendo como variáveis respostas coeficiente de partição (K) e rendimento (Y) utilizando planejamento experimental.
- Avaliar a produção do ácido clavulânico na fermentação extrativa em SDFA e verificar os seguintes parâmetros: consumo de substrato, formação de produto, rendimento da extração e coeficiente de partição.

- Realizar a produção do ácido clavulânico em biorreator avaliando os seguintes parâmetros: crescimento celular, consumo de substrato, concentração de produto e produtividade.



## Capítulo I – Revisão de Literatura

*Este capítulo apresenta uma revisão geral da literatura acerca do estado da arte de sob processos de produção e purificação do ácido clavulânico por micro-organismos.*

## I.1 Actinobactérias

Actinobactérias ou actinomicetos são bactérias Gram-positivas, no entanto essas bactérias possuem aspectos morfológicos e de ciclo celular diferenciados dos demais organismos Gram-positivos. Podem ser aeróbios, microaerófilos ou anaeróbios. São conhecidos oito gêneros: *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Streptomyces*, *Mycobacterium*, *Actinomyces*, *Bifidobacterium* e *Butyrivibrio* (Lacaz et. al., 2002). Em outra classificação *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (2004), classifica os actinobactérias dentro do Filo e da classe Actinobacteria, a qual compreende 6 ordens, 39 famílias, 139 gêneros e centenas de espécies. Actinobactérias compartilham duas características em comum: todas são Gram-positivas e apresentam alta razão de guanina/citosina em seu DNA, podendo exceder 70% do total de bases nucleotídicas, variando de 51% em *Corynebacteria* e mais de 70% em *Streptomyces* e *Frankia*. Uma exceção a isso é o genoma do patógeno obrigatório *Tropheryma whippelii*, com menos de 50% de G+C em seu DNA.

Assemelham-se morfológicamente aos fungos filamentosos, no entanto seus filamentos são constituídos de células muito menores quando comparadas às dos fungos filamentosos (Tortora et al., 2012). Em algumas actinobactérias a reprodução ocorre pela formação de esporos, esporangiósporos ou conidiósporos. Os esporos constituem a principal forma de multiplicação e são produzidos em grande número, cada esporo com potencial de germinação e crescimento levam ao surgimento de um novo organismo. Embora não sejam resistentes ao calor, os conidiósporos e os esporangiósporos são resistentes às dessecações e podem auxiliar na sobrevivência das espécies durante a estiagem. Em outras espécies, como *Nocardia*, a reprodução ocorre por meio da fragmentação, em que as hifas fragmentam-se em muitas células baciliformes e cocóides, cada uma capaz de formar um novo micélio (Ventura et. al., 2007).

Actinobactérias estão amplamente distribuídas em ambientes naturais e artificiais, e desempenham um papel importante na degradação da matéria orgânica (Sateesh et al., 2011). Além disso, actinobactérias são fontes inigualáveis de metabólitos secundários de bioativos, tais como: antibióticos, agentes antitumorais, agentes imunossuppressores, enzimas (Ravikumar et al., 2011), cosméticos, vitaminas, materiais nutricionais, herbicidas, pesticidas (Ogunmwonyi et al., 2010; Hemashenpagam et al., 2011).

Estas bactérias possuem extraordinária importância em várias áreas da ciência e da medicina, particularmente na produção de antibióticos, cerca de 23.000 metabólitos secundários bioativos produzidos por microrganismos têm sido relatados, dentre estes cerca de 10.000 compostos são produzidos por actinobactérias (Vimal et al., 2009).

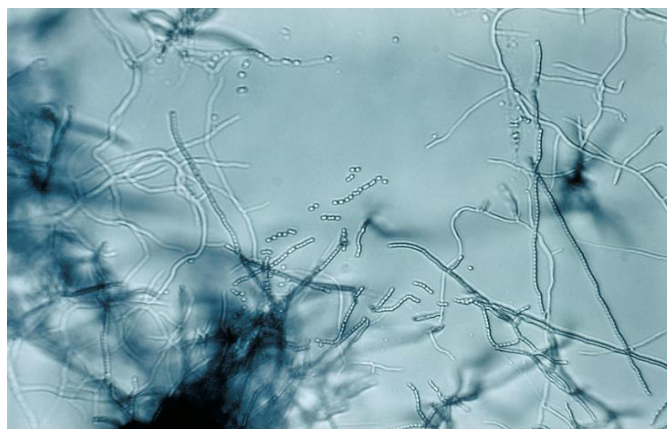
### **I.1.2 Gênero: *Streptomyces***

*Streptomyces* é o maior gênero de actinobactérias com o maior número de espécies, sendo descritas mais de 500 espécies (Figura 1) (Raja e Prabakarana, 2011). Encontrados em uma variedade de ambientes, mas predominantemente como saprófitas no solo e em vegetais em decomposição, muitos *Streptomyces* produzem esporos e uma substância volátil, a geosmina, que lhes confere um odor característico de “terra molhada” (Kieser et al., 2000).

As actinobactérias do gênero *Streptomyces* possuem um ciclo de vida bastante interessante, semelhante em muitos aspectos ao ciclo de vida de eucariotos inferiores como os fungos filamentosos (Figura 2).

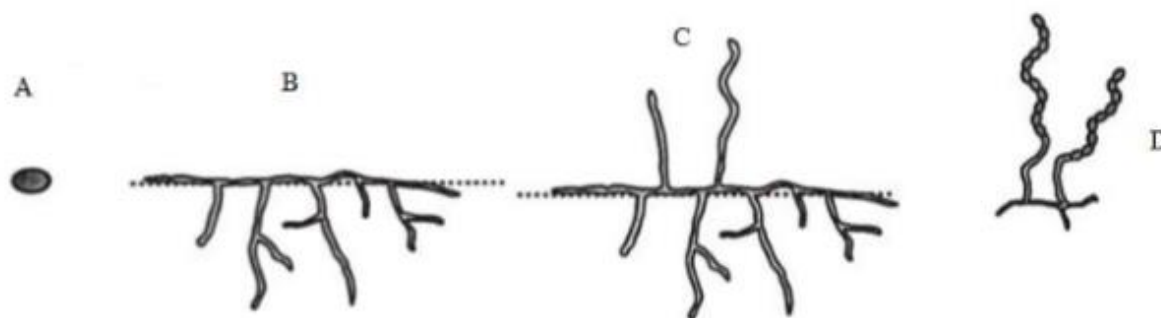
A forma reprodutiva consiste de esporos que vão dar início ao desenvolvimento de um micélio vegetativo pela produção de dois tubos germinativos. Este micélio se ramifica em uma rede de hifas que emerge da superfície da colônia para o ar projetando um micélio aéreo, que irá constituir uma hifa aérea e esta por sua vez originar os esporos. Com a maturação dos

esporos o ciclo de vida é completado. Uma vez liberado da cadeia de esporos e dispersados no ambiente, a germinação de cada esporo dará origem a um novo micélio. Em resposta à depleção de nutrientes ou a outros sinais, o desenvolvimento metabólico tem início com a produção de metabólitos secundários ao mesmo tempo em que ocorre a mudança morfológica do micélio vegetativo a micélio aéreo (Worrall e Vijgenboom, 2010).



**Figura 1.** Imagem ilustrativa de *Streptomyces* sp. (Fonte: <http://www.websters-online-dictionary.org/definitions/Streptomyces>)

Uma das propriedades mais relevantes dos *Streptomyces* é a capacidade de produzir metabólitos secundários como antibióticos, herbicidas, antiparasitários, entre outras substâncias farmacologicamente ativas como imunossupressores e agentes antitumorais (Ohnishi et al., 2008). Os antibióticos obtidos a partir do gênero *Streptomyces* são classificados como tetraciclina aminoglicosídeos (streptomicina e seus derivados), macrolídeos (eritromicina e seus derivados), cloranfenicol e muitos outros não  $\beta$ -lactâmicos (Raja e Prabakarana, 2011).



**Figura 2.** Ciclo de vida dos *Streptomyces*. (A) Esporo; (B) Micélio vegetativo; (C) Micélio aéreo; (D) Esporulação (Reproduzido de Worrall e Vijgenboom, 2010).

Aproximadamente 60% dos antibióticos desenvolvidos para a agricultura e horticultura têm sido isolados de espécies deste gênero (Hwang et al., 2001). Na Tabela 1 estão descritos alguns agentes antimicrobianos produzidos nos últimos anos por actinobactérias do gênero *Streptomyces*.

Recentemente, pesquisas visando a obtenção de novos compostos antimicrobianos a partir de espécies de *Streptomyces*, utilizam a coleção de micro-organismos isolados em diferentes ambientes, tais como ambientes marinhos. Estes estudos têm alcançado resultados importantes. Outra iniciativa importante neste aspecto, é a do Centro de Biotecnologia da Amazônia - CBA, que vem estudando micro-organismos isolados da região amazônica, uma vez que esta região, possui uma grande diversidade de micro-organismos, com capacidade de produzir novos antibióticos; excelentes resultados foram alcançados. Entretanto, Há ainda a necessidade de regulamentação do uso de antibióticos para incentivar as empresas farmacêuticas a investir em desenvolvimento de novos antibióticos. O principal desafio

continua a ser a nível regulamentar, a fim de encontrar uma solução que garanta a viabilidade comercial do desenvolvimento de antibióticos (PROCÓPIO et al., 2012).

**Tabela 1.** Agentes antimicrobianos produzidos pelo gênero *Streptomyces*.

<b>Antibiótico</b>	<b>Agente produtor</b>	<b>Referência</b>
Ácido clavulânico	<i>Streptomyces clavuligerus</i> ATCC 27064	Teodoro et al., 2006
Ácido clavulânico	<i>Streptomyces</i> sp DAUFPE 3060	Viana et al., 2009
Ácido griseoluteico	<i>Streptomyces griseoluteus</i> P510	Wang et al., 2011
Cefamicina C	<i>Streptomyces clavuligerus</i> NT4	Bussari et al., 2008
Antifúngico	<i>Streptomyces rimosus</i> MY02	Yu et al., 2008
Oxitetraciclina	<i>Streptomyces rimosus</i> M40189	Tang et al., 2011
Vernamicina-A	<i>Streptomyces ramulosus</i> AZ-SH-2	Atta et al., 2011
Laidlomocina	<i>Streptomyces</i> sp. CS684	Yoo et al., 2007
Caboxamicina	<i>Streptomyces</i> sp. NTK 937	Hohmann et al., 2009

## I.2 Antibióticos $\beta$ -lactâmicos

Antibióticos são compostos naturais ou sintéticos capazes de inibir o crescimento ou causar a morte de fungos e bactérias. Quando causam a morte da bactéria são classificados como bactericidas, e bacteriostáticos quando apenas inibem temporariamente o crescimento microbiano. O primeiro antibiótico de origem sintética foi desenvolvido por Ehrlich em 1910, denominado de Salvasan utilizado no tratamento da sífilis. O segundo antibiótico sintético foi desenvolvido em 1934, a proflavina amplamente utilizada no tratamento de infecções em ferimentos durante a Segunda Guerra Mundial. No entanto, a proflavina, devido sua alta toxicidade, não pode ser utilizada no tratamento de infecções sistêmicas, ficando evidente a

necessidade de agentes mais eficazes. No ano seguinte, estudos realizados por Gerhard Domagk mostraram que o corante vermelho prontossil, apresentava atividade *in vivo* frente a infecções causadas por *Streptococcus*. O prontossil originou uma grande classe de antibióticos sintéticos eficazes contra infecções sistêmicas, as sulfas ou sulfonamidas (Guimarães et al., 2010).

Mesmo com todos os avanços alcançados até então no desenvolvimento de fármacos, o grande marco no tratamento das infecções bacterianas ocorreu em 1928 com a descoberta da penicilina (Guimarães et al., 2010). O médico microbiologista Alexander Fleming, em experimentos com cultura de bactérias notou uma contaminação por fungos, e verificou que o crescimento bacteriano ao redor da colônia contaminante havia sido inibido. Fleming então, concluiu que a colônia de fungos estava produzindo algum composto antimicrobiano e após isolamento e identificação verificou-se que se tratava de uma espécie do gênero *Penicillium*. Em estudos posteriores Fleming tentou isolar e identificar o agente antimicrobiano produzido pelo *Penicillium*, não obtendo sucesso devido a grande instabilidade do composto. Após dez anos da descoberta de Fleming, Florey e Chain chegaram ao extrato bruto contendo a penicilina, que foi testada clinicamente com resultados satisfatórios, tornando-se clinicamente disponível em 1942. Por seus feitos Fleming, Florey e Chain dividiram o prêmio Nobel de Medicina em 1945 (Oliveira et al., 2009).

Após descoberta da penicilina entre os anos 1940 e 1960 se intensificaram os estudos para obtenção de novos antimicrobianos, foram realizadas várias de triagens com diferentes micro-organismos visando à produção desses compostos. Neste período, vários antibióticos  $\beta$ -lactâmicos produzidos por processos fermentativos foram descobertos, como exemplo podemos citar a descoberta da estreptomicina em 1943 por Waksman e colaboradores, obtida a partir de culturas da bactéria *Streptomyces griseus* e introduzida no uso clínico em 1944. De forma importante, a estreptomicina mostrou-se eficaz contra bactérias Gram-negativas e contra a

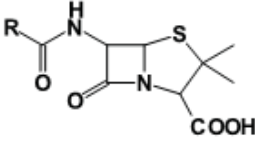
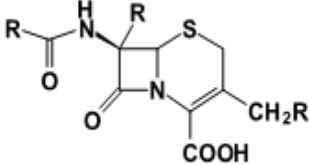
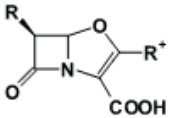
*Mycobacterium tuberculosis*, inovando o tratamento contra a tuberculose (Ebrahim et al., 2010).

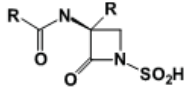
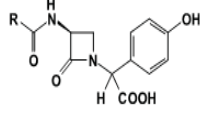
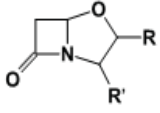
A principal característica compartilhada por todos os compostos  $\beta$ -lactâmicos, é o anel azetidínico de quatro membros ou anel  $\beta$ -lactâmico. Este anel pode apresentar-se isolado, como é o caso particular dos monobactâmicos, mas em geral encontra-se ligado a outro anel de cinco (tiazolidínico) ou de seis (hidrotiazínico) membros, formando as penicilinas e cefalosporinas, respectivamente. Os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos são subdivididos em grupos de acordo com sua estrutura química: penicilinas, cefalosporinas e cefamicina, carbapeninas, monobactamas e as clavanas como podem ser observados na Tabela 2 (Haebich e Nussbaum, 2006).

A estrutura bicíclica é instável e bastante susceptível ao ataque de nucleófilos que podem hidrolisar o anel  $\beta$ -lactâmico inativando sua atividade biológica. No caso das penicilinas o oxigênio presente na cadeia lateral participa como nucleófilo em reação intramolecular que leva a abertura do anel  $\beta$ -lactâmico em meio ácido, fato que inviabiliza sua administração por via oral. Visando aumentar a estabilidade em meio ácido, grupos que retiram elétron foram adicionados no carbono  $\alpha$  ao carbono carbonílico da cadeia lateral em penicilinas semi-sintéticas (ampicilina, amoxicilina, oxacilinas) (Guimarães et al., 2010).



**Tabela 2.** Divisão dos grupos de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos de acordo com a estrutura química. (Dias, 2009).

Classe	Subclasse	Estrutura Química	Exemplos
<b>Penicilinas</b>	Penicilinas	<b>Penam</b>	Penicilina
	Aminopenicilinas		amoxicilina, ampicilina
	Ureidopenicilinas		Piperacilina
	Carboxipenicilinas		Ticarcilina
	Penicilinas resistentes às Penicilinases		cloxacilina, meticilina, oxacilina
	Amidinopenicilina		Meciliname
<b>Cefemes</b>	Cefalosporinas de 1 <sup>a</sup> geração	<b>Ceph-3-em</b>	cefalotina, cefazolina
	Cefalosporinas de 2 <sup>a</sup> geração		Cefuroxima
	Cefalosporinas de 3 <sup>a</sup> geração		cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona
	Cefalosporinas de 4 <sup>a</sup> geração		Cefepima
	Cefamicinas		Cefoxitina
<b>Penemes</b>	Carbapenemes	<b>Carbapenem</b>	ertapenem, imipenem, meropenem
			

<b>Monobactâmicos</b>	Monobactâmicos	<b>Monolactam</b>	Aztreonam
			
	Nocardicinas		
<b>Clavans</b>	Clavam	<b>Clavam</b>	ácido clavulânico
			

### 1.2.2 Mecanismo de ação dos antibióticos $\beta$ -lactâmicos

Todas as bactérias apresentam uma parede rígida, responsável pela forma da célula bacteriana e que lhes conferem resistência. De acordo com as propriedades de suas paredes as bactérias são divididas em dois grupos: bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. A parede celular das bactérias Gram-positivas é simples apresenta-se de forma espessa e é constituída principalmente por peptidoglicanos. Nas bactérias Gram-negativas a parede celular é complexa sendo formada por 4 camadas diferentes incluindo por peptídeosglicanos, lipoproteínas e lipopolissacarídeos (Murray et al., 2005).

Em bactérias dividindo-se ativamente, os  $\beta$ -lactâmicos atuam inibindo as enzimas transpeptidase, carboxipeptidase e endopeptidase, estas enzimas em bactérias Gram-positivas estão localizadas na camada de peptidoglicanos. Nas bactérias Gram-negativas entre a camada de peptidoglicano e a membrana citoplasmática confina-se o espaço periplásmico, e as enzimas alvo dos  $\beta$ -lactâmicos encontram-se no folheto externo da membrana citoplasmática. As enzimas transpeptidases são denominadas de “PBP” (*Penicilin Binding Proteins*). Esta

inibição previne o desenvolvimento da estrutura de peptídeoglicano pois estas enzimas estão envolvidas na criação da ligação cruzada entre as cadeias peptídicas (Murray et al., 2005).

Os peptídeoglicanos são constituídos por unidades de repetição básica e alternadas de um dissacarídeo formado por: N-acetil-glucosamina e ácido N-acetil-murâmico. Estas cadeias lineares estão ligadas por filamentos laterais de aminoácidos que promovem a união entre os ácido N-acetil-murâmico. Existem quatro aminoácidos L e D alternados, sendo os mais comuns: L-alanina, D-alanina, ácido D-glutâmico, D-glutamina e L-lisina ou ácido diaminopimélico (DAP). O último dissacarídeo é modificado por um característico pentapeptídeo, que varia entre espécies de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, mas que sempre é finalizado em dois resíduos de D-alanina (Murray et al., 2005; Wilke et al., 2005).

As unidades individuais de peptídeoglicano são produzidas dentro da célula, mas a sua última ligação cruzada é catalisada fora da membrana citoplasmática por um grupo de enzimas ancoradas na membrana bacteriana, conhecidas como as transpeptidases de parede celular. Nesta reação de ligação cruzada, uma ligação peptídica é formada entre a penúltima D-alanina de uma cadeia e o final amino livre de um DAP (bactérias Gram-negativas) ou um resíduo de L-lisina (bactérias Gram-positivas) na outra cadeia. A ligação formada com o penúltimo resíduo de D-alanina, faz com que a D-alanina terminal seja clivada, reação conhecida como reação de transpeptidação. As transpeptidases ou PBPs atuam com o acil-D-alanil-D-alanina, originando um complexo enzima-acil-D-alanil e promovendo a eliminação do terminal D-alanina. (Murray et al., 2005; Normark e Normark, 2002).

Os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos inibem eficientemente as transpeptidases bacterianas, e o que lhes conferem essa capacidade é a estereoquímica semelhante da porção  $\beta$ -lactam do antibiótico com o substrato D-alanina-D-alanina. Na presença do antibiótico, as transpeptidases

formam um complexo covalente enzima-penicilloil que serve para bloquear a reação normal de transpeptidação. O que resulta em um peptídeoglicano fracamente reticulado tornando as bactérias susceptíveis a lise celular e morte (Wilke *et al.*, 2005; Murray *et al.*, 2005).

### **I.3 Resistência Bacteriana e Produção de $\beta$ -lactamases**

Desde a introdução da penicilina para uso clínico em 1942, muitos outros derivados  $\beta$ -lactâmicos com atividade antibiótica superior foram descobertos e disponibilizados no mercado, no entanto, a eficiência destes compostos tem sido ameaçada pela crescente resistência bacteriana (Oliveira *et al.*, 2008). As bactérias multiplicam-se rapidamente, sofrem mutações, podendo trocar de material genético entre linhagens da mesma espécie ou de espécies diferentes. Estes micro-organismos possuem alta capacidade de adaptação a diversos fatores como, por exemplo, exposição a agentes químicos potentes (Guimarães *et al.*, 2010).

O aparecimento da resistência microbiana a antibióticos e outras drogas foi, é e provavelmente continuará a ser um dos grandes problemas da medicina, pois é causada pela mutação espontânea e recombinação de genes, que criam variabilidade genética sobre a qual atua a seleção natural dando vantagens aos mais aptos e neste caso, as drogas atuam como agentes seletivos. O termo resistente se refere a aqueles microrganismos que não são inibidos por concentrações habitualmente alcançadas no sangue ou tecidos do correspondente antimicrobiano, ou aqueles que apresentam mecanismos de resistência específicos para o agente antimicrobiano utilizado (Mota *et al.*, 2005).

As bactérias são capazes de inativar os agentes antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos através de quatro mecanismos principais (Figura 3), o mais comum é a destruição do antibiótico - os agentes patogênicos produzem enzimas que catalisam a degradação do antibiótico ou modificam

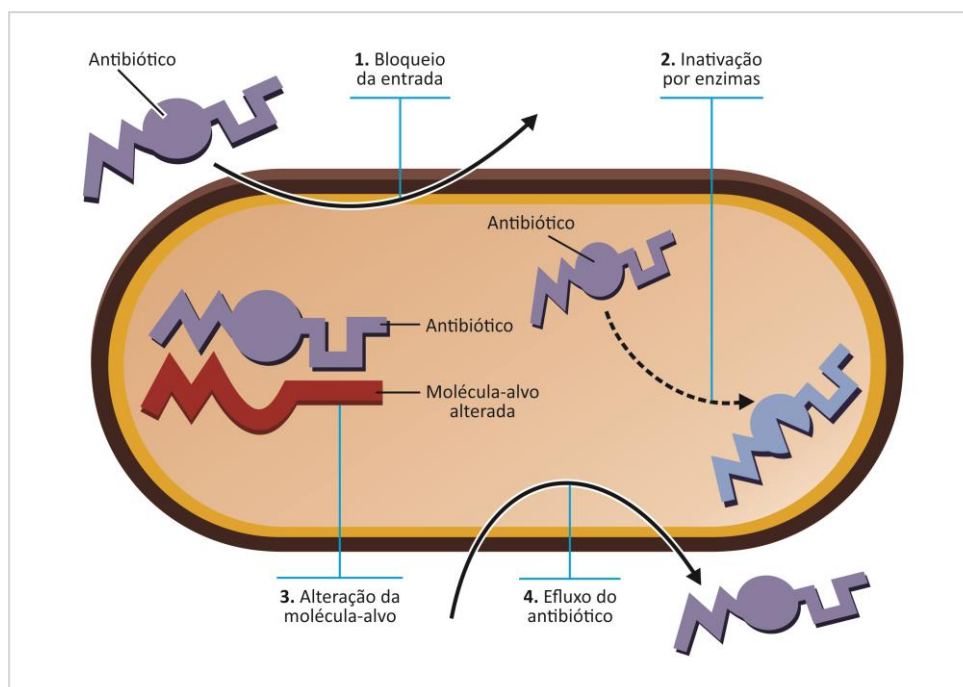
grupos funcionais farmacologicamente importantes presentes em sua estrutura, criando funções inativas para o reconhecimento molecular, o principal exemplo deste mecanismo de resistência são as enzimas  $\beta$ -lactamases produzidas por bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Silveira et al., 2006).

Outro mecanismo de resistência utilizado por bactérias é o efluxo contínuo do antibiótico - genes mutantes superexpressam proteínas transportadoras de membrana responsáveis pela entrada e saída de substâncias no meio citoplasmático, fazendo com que a retirada do antibiótico para o meio extracelular seja mais rápida que a sua difusão pela membrana bacteriana, mantendo uma concentração insuficiente para atuar como bloqueador de funções celulares. Sendo está a maior causa de resistência em espécies de *Pseudomonas* e em outras bactérias Gram-negativas. Pode ainda ocorrer uma reprogramação e modificação da estrutura-alvo do antibiótico. Alvos macromoleculares do antibiótico, como ribossomos, proteínas e constituintes da parede celular, são estruturalmente modificados a partir de genes que os expressam, afetando o reconhecimento do fármaco pelo alvo e diminuindo sua potência. (Silveira et al., 2006; Wilke et al., 2005).

Como foi mencionado anteriormente, a produção de  $\beta$ -lactamases é considerado o principal mecanismo associado à resistência aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, como penicilinas, cefamicinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenens. As  $\beta$ -lactamases lizam o anel  $\beta$ -lactâmico por hidroxilação irreversível da ligação amida, com inativação do antibiótico. Embora o resultado final de sua ação seja o mesmo, a atividade enzimática é variável de acordo com o tipo de  $\beta$ -lactamase produzida e os diversos substratos existentes. Existe uma variação em especificidade de substrato entre as  $\beta$ -lactamases: algumas hidroxilam preferencialmente as penicilinas, outras têm atração pelas cefalosporinas e algumas enzimas inativam ambas as classes de antibióticos. Em alguns patógenos, verifica-se a produção de diferentes tipos de  $\beta$ -

lactamases, onde diferentes cepas podem produzir diferentes enzimas, ou uma única cepa pode produzir mais de um tipo de enzima (Souza Junior et al., 2004).

As  $\beta$ -lactamases são comumente classificadas de acordo com dois esquemas gerais: a classificação molecular de Ambler e a classificação funcional de Bush-Jacoby-Medeiros (Abreu e Gonçalves, 2010). Ambler (1980) propôs, primeiramente, uma classificação para essas enzimas e designou quatro classes de  $\beta$ -lactamases que tinham sua sequência de aminoácidos conhecidas: A (serina- $\beta$ -lactamase), B (metalo- $\beta$ -lactamase), a classe C foi descrita posteriormente e a classe D, que hidrolisa preferencialmente a oxacilina.

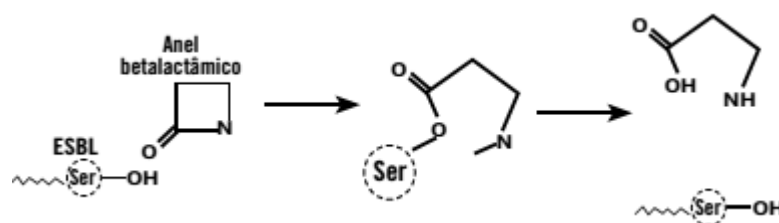


**Figura 3.** Mecanismos de resistência apresentados por bactérias (Tortora, 2012).

As classes A, C e D são as chamadas serino- $\beta$ -lactamases, possuem mecanismos semelhantes que em geral envolvem a criação de um nucleófilo de serina por desprotonação de

um sítio ativo de serina com uma base. Quando a enzima associa-se não covalentemente ao anel  $\beta$ -lactâmico, o anel é, então, atacado pela hidroxila livre do lado do sítio ativo do resíduo de serina, resultando na formação de um grupo acil-éster. A hidrólise finalmente libera a enzima ativa e o antibiótico hidrolisado inativo, formando água e ácido peniciloico (Silva e Lincopan, 2012). A Figura 4 mostra o mecanismo de hidrólise dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos por ação das enzimas serino- $\beta$ -lactamases.

A classe B das  $\beta$ -lactamases são metaloenzimas, essas enzimas caracterizam-se por necessitarem de dois íons divalentes, usualmente zinco, como co-fator para atividade catalítica, por terem a mesma estrutura tridimensional e por apresentarem resíduos conservados, os quais são responsáveis pela interação da enzima com cátions divalentes. Além disso, essas enzimas são inibidas pelo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) ou por compostos derivados do ácido tiolático (i.e., ácido 2-mercaptopropiônico), não sendo impedidas por inibidores de serino- $\beta$ -lactamases disponíveis comercialmente, como o ácido clavulânico, o sulbactam e o tazobactam (Mendes, 2006).



**Figura 4.** Mecanismo de hidrólise de antibiótico  $\beta$ -lactâmico por serino- $\beta$ -lactamases (Silva e Lincopan, 2012).

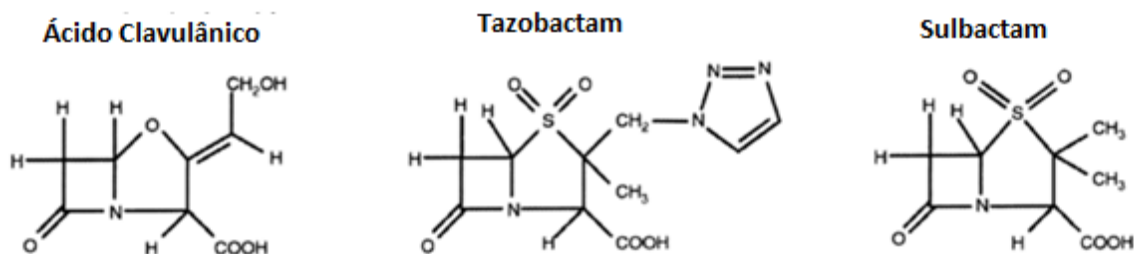
Por outro lado, Bush classifica essas  $\beta$ -lactamases de acordo com suas funções e características estruturais e bioquímicas, dividindo-as em quatro grupos definidos pelos

substratos e sensibilidade por seus inibidores. Essa classificação é dada por algarismos arábicos, sendo divididos em subgrupos designados por letras (a-f) (Abreu e Gonçalves, 2010).

#### I.4 Inibidores de $\beta$ -lactamases

Com o surgimento de organismos resistentes a antibióticos, o tratamento de doenças infecciosas ameaça retornar a era pré-antibiótica. Estratégias que visam superar a resistência adquirida por micro-organismos são de crescente interesse (Saudagar et al., 2008). Duas estratégias bacterianas têm sido utilizadas para superar a resistência dos  $\beta$ -lactâmicos à  $\beta$ -lactamase. A primeira é a modificação da estrutura do antibiótico de forma que não haja mais substrato para a enzima hidrolisar, e a segunda pela inibição da enzima por um composto que seja estruturalmente relacionado ao substrato  $\beta$ -lactâmico (Moosdeen, 1996).

Os inibidores de  $\beta$ -lactamases são estruturalmente semelhantes às penicilinas, retendo a ligação amida do grupo  $\beta$ -lactâmico, mas possuem uma cadeia lateral modificada (Figura 3). Tais aspectos estruturais permitem aos inibidores ligar-se irreversivelmente às  $\beta$ -lactamases como substratos suicidas, mantendo-as inativas. Três inibidores de  $\beta$ -lactamase são frequentemente usados na clínica médica, sulbactam, tazobactam e ácido clavulânico (Figura 5) (Williams, 1999).



**Figura 5.** Estrutura química dos principais inibidores de  $\beta$ -lactamases (adaptado de Williams, 1999).



O Sulbactam é um composto sintético derivado do núcleo básico da penicilina, possui a designação química de (2S, 5R) -3, 3-dimetil-7-oxo-4-tia-1-azabicyclo [3.2.0] heptano-2-carboxilato 4,4-dióxido. É utilizado para aumentar o espectro antibacteriano de penicilinas e cefalosporinas contra organismos produtores de penicilinase- $\beta$ -lactamase tais como o *Staphylococcus aureus* e *Moraxella catarrhalis* que sejam resistentes a ampicilina (Singh, 2004). Nos EUA o sulbactam é utilizado em combinação com cefoperazone (Sulperazone) e em combinação com a ampicilina (Sultamicina). Da mesma forma o Tazobactam também é um composto sintético, utilizado em combinação com a piperacilina (Tazocin). Ele amplia o espectro de piperacilina, tornando-o eficaz contra organismos que expressam  $\beta$ -lactamase e normalmente degradam piperacilina (Saudagar et al., 2008). Entretanto, segundo Payne et al., (1983) o ácido clavulânico apresenta atividade inibidora de enzimas  $\beta$ -lactamase quase 5 vezes maior que o tazobactam e quase 600 vezes maior que o sulbactam (ácido clavulânico=0,03  $\mu$ M; tazobactamo=0,14  $\mu$ M; sulbactamo=17  $\mu$ M).

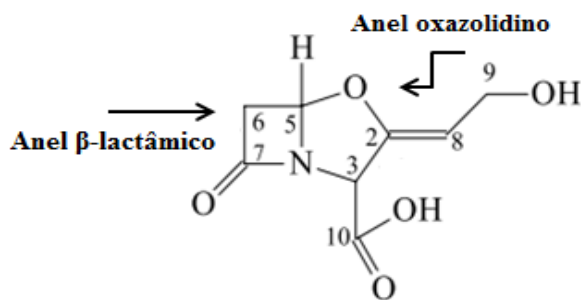
### **I.5 Ácido Clavulânico (AC)**

Em meados da década de 60 iniciou-se no *Beecham Research Laboratories*, estudos para seleção de novos micro-organismos produtores de compostos  $\beta$ -lactâmicos. Em seus estudos Brown *et al.* em 1976 identificou o AC como um produto do metabolismo secundário de *Streptomyces clavuligerus*.

O AC é classificado como um metabolito clavam e caracteriza-se por um núcleo bicíclico, formado por um anel de quatro membros fundido com um anel de oxazolidina de cinco membros. Esta molécula apresenta uma estrutura molecular muito semelhante à dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos clássicos, a exemplo da penicilina, exceto pela substituição do enxofre do anel tiazolidina da penicilina por um oxigênio no anel de oxazolidina do AC, um substituinte

acilamino está ausente em C-6, e um grupo *exo*- $\beta$ -hidroxietilideno é ligado em C-2, resultando num composto que inativa irreversivelmente as  $\beta$ -lactamases, ao invés de ser clivada pela enzima (Song et al., 2010).

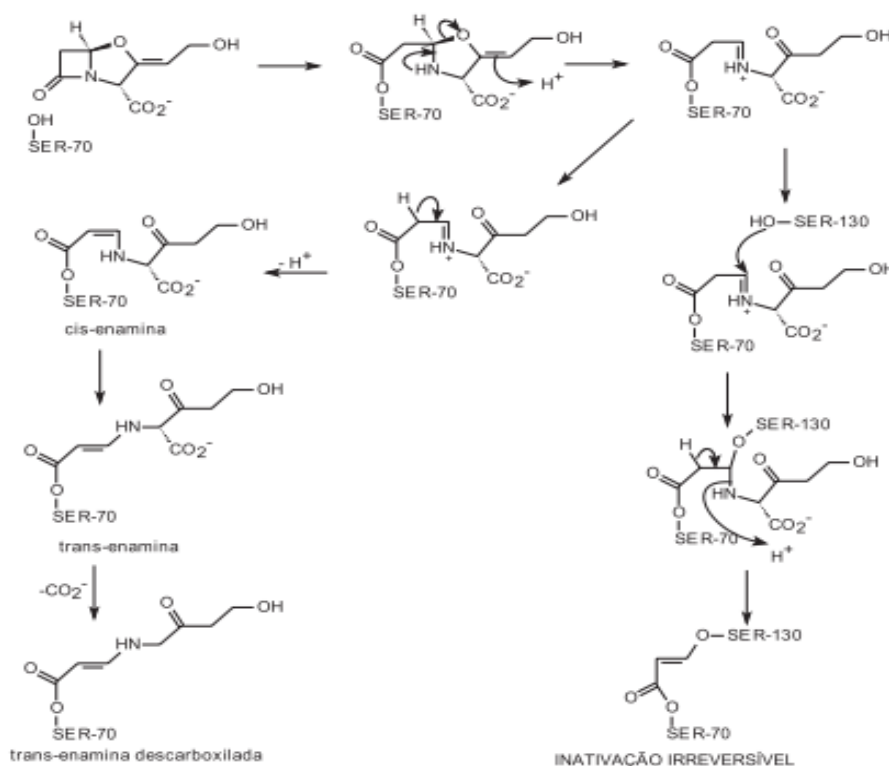
Nos estudos realizados por Brow et al (1976) foram ainda identificadas outras espécies produtoras de Clavans moléculas que possuem em sua estrutura tal como o AC um anel  $\beta$ -lactâmico condensado a um anel oxazolidina (Figura 6), no entanto o AC possui uma estereoquímica característica *2R*, *5R*, essencial para lhe conferir a atividade inibitória, enquanto que todas as outras moléculas Clavans apresentavam estereoquímica *2S*, *5S*, desta forma, não apresentando qualquer atividade antibiótica ou de inibição das  $\beta$ -lactamases (Saudagar et al., 2008). A capacidade de micro-organismos produzirem o AC parece ser mais restrita do que a capacidade para produção de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos convencionais, uma vez que apenas espécies do gênero *Streptomyces* têm sido relatadas na literatura como produtoras de AC (Saudagar et al., 2008).



**Figura 6.** Estrutura química do Ácido Clavulânico.

O AC possui em sua estrutura o anel  $\beta$ -lactâmico típico dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos comumente utilizados tais como: penicilinas e cefalosporinas. No entanto, este composto apresenta baixa atividade antibiótica intrínseca. A similaridade química e estrutural do AC com outras moléculas  $\beta$ -lactâmicas permite-lhe atuar como inibidor competitivo das enzimas  $\beta$ -lactamases segregadas por algumas bactérias (Viana Marques et al., 2011), por este motivo o

AC é prescrito clinicamente em combinação com outros antibióticos. Na presença de baixas concentrações de AC, muitas bactérias produtoras de  $\beta$ -lactamases tornam-se sensíveis às penicilinas e cefalosporinas comercialmente disponíveis. Quando utilizado juntamente com outros antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, ocorre uma ligação irreversível entre o grupo hidroxila da serina da  $\beta$ -lactamase e o AC, produzindo um intermediário estável, inativando a enzima e permitindo, assim, que o outro antibiótico atue no combate à infecção. O mecanismo de ação do AC pode ser observado na Figura 7.



**Figura 7.** Mecanismo de ação do ácido clavulânico (Oliveira et al., 2008).

### 1.5.1 Biossíntese do Ácido Clavulânico

Quando iniciaram os estudos sobre a biossíntese do AC existiram especulações de que esta molécula e outros compostos  $\beta$ -lactâmicos teriam sua origem a partir uma via biossintética

em comum. Esta hipótese foi refutada pela demonstração de que enzimas responsáveis pela biossíntese da penicilina/cefamicina foram purificadas e apresentaram especificidade para substratos que eram incompatíveis com os precursores do AC (Saudagar et al., 2008).

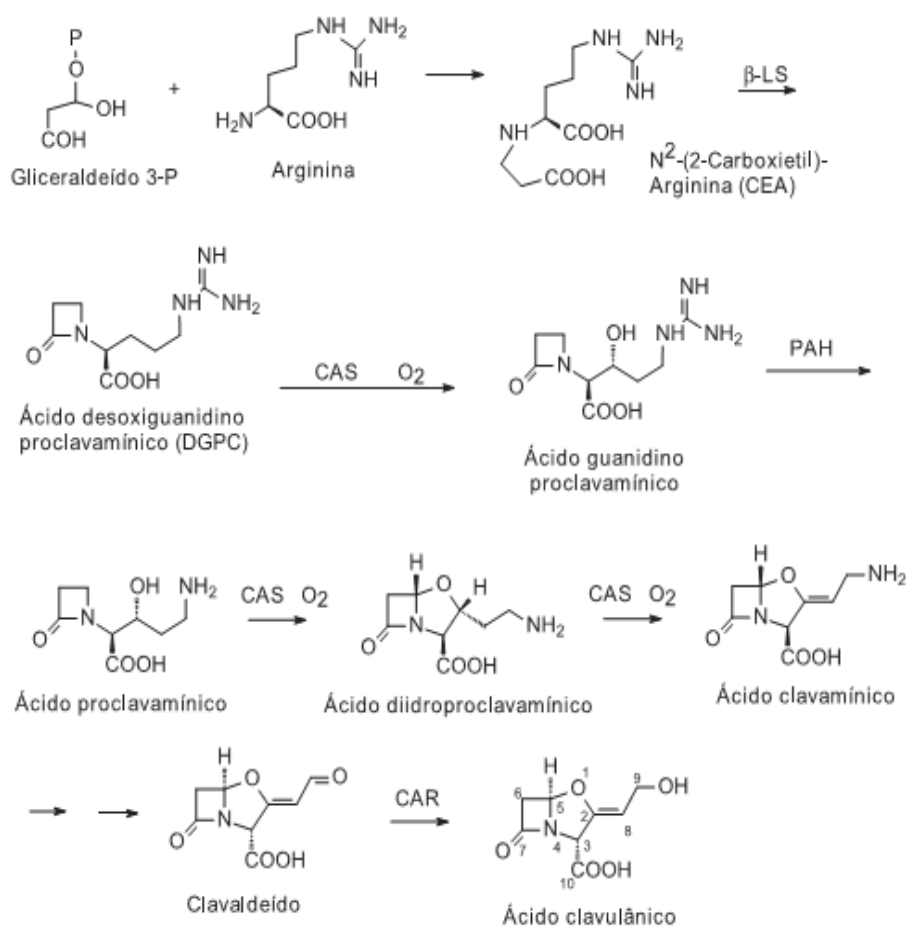
Elson et al., (1978) sugeriram que parte da estrutura do ácido clavulânico seria oriunda do ácido glutâmico, enquanto que o glicerol é principal precursor do anel  $\beta$ -lactâmico (carbonos C5, C6 e C7), sem qualquer rearranjo intermediário dos três carbonos.

Os aminoácidos arginina e a ornitina participam da biossíntese do AC e exercem uma estimulação dependente da concentração. Os aminoácidos são incorporados na molécula de AC nos carbonos C-2, C-3, C-8 E C-10. A incorporação da arginina na molécula de AC não estabelece a ornitina como precursor direto, pois a enzima ornitinacarbamil transferase de *S. clavuligerus* possui atividade arginase, que converte a arginina em ornitina (Oliveira et al., 2008). No entanto, em 1993, Valentine e colaboradores concluíram em seus trabalhos que os carbonos C2, C3, C8, C9 e C10 são derivados da arginina. Tais autores se basearam no fato de que *S. clavuligerus*, incapaz de produzir arginina, a partir da ornitina, não produz ácido clavulânico e concluíram então, que a arginina seria o último precursor da biossíntese do ácido clavulânico.

A rota biosintética da formação do AC foi relatada em detalhes por Oliveira et al. (2008) em seu trabalho de revisão como pode ser observado na Figura 8.

O primeiro intermediário formado para a biossíntese do AC é um composto acíclico o N2-(2-carboxietil)-arginina – (CEA), formado a partir da condensação de precursores de piruvato e arginina. O segundo intermediário é o Ácido desoxiguanidino proclavamínico (DGPC), esse composto já possui o anel  $\beta$ -lactâmico em sua estrutura, a enzima responsável pela formação deste anel é chamada de  $\beta$ -lactam sintetase ( $\beta$ LS).

O Ácido desoxiguanidino proclavamínico é então hidrolisado em três reações catalisadas pela enzima clavaminato sintase (CAS). Na primeira reação catalisada pela CAS, onde o Ácido desoxiguanidino proclavamínico é convertido em Ácido guanidino proclavamínico, este sofre a ação de uma amidinohidrolase (PAH) que remove o grupo guanidino derivado da arginina dando origem ao Ácido proclavamínico.



**Figura 8.** Biossíntese do Ácido Clavulânico (Oliveira et al., 2008). Onde:  $\beta$ -LS=beta lactam sintase; CAS=Clavaminato sintase; PAH=Proclavamínico Aminidino Hidrolase; CAR=Clavaldeído redutase ou CAD=ácido clavulânico desidrogenase.

O Ácido proclavamínico é transformado em Ácido clavamínico através de uma reação com duas etapas catalisada pela CAS, com formação de um intermediário o Ácido diidroiclavamínico. A conversão do Ácido clavamínico em AC exige a inversão da sua estereoquímica, bem como a substituição de um grupo amino por um grupo hidroxila na cadeia lateral, no entanto os passos destas reações ainda não foram bem elucidados. A existência de um aldeído intermediário com a mesma estereoquímica e o envolvimento de duas enzimas a Clavaldeído redutase (CAR) e a Ácido clavulânico desidrogenase (CAD) têm sido relatada (Saudagar et al., 2008; Nicholson et al., 1994).

### ***1.5.2 Influência da Composição do Meio de Cultivo na Produção de AC***

A produtividade de metabolitos microbianos, em geral, está intimamente relacionada com o processo de fermentação. A escolha de tipos de nutrientes, suas concentrações e os parâmetros físicos de funcionamento, possuem diferentes efeitos sobre a acumulação de metabolitos. A definição do meio de cultivo é de fundamental importância no desenvolvimento de bioprocessos (Viana Marques et al., 2009).

A influência de meios de cultivo contendo concentrações variadas de fonte de nitrogênio e de carbono sob a produção de AC por *S. clavuligerus* em diferentes condições de cultivo tem sido excessivamente investigada. Estudos mostram que soja e seus derivados são uma importante fonte de nitrogênio para a produção de AC. Ortiz et al. (2007) utilizaram farinha de soja e proteína isolada da soja em diferentes concentrações para a produção de AC por *S. clavuligerus* e observaram que a produção de AC obtida no meio contendo a farinha de soja foi duas vezes superior em comparação com o meio contendo a proteína isolada da soja. Em uma segunda etapa do mesmo trabalho esses autores estudaram a utilização do glicerol e de

diferentes concentrações de óleo de soja como fontes de carbono, os resultados obtidos demonstraram que o óleo de soja só foi consumido após total exaustão do glicerol no meio.

Viana Marques et al., (2011) realizaram uma triagem das variáveis que influenciam a produção de AC pelo micro-organismo *Streptomyces* DAUFPE 3060 utilizando um planejamento estatístico fracionário  $2^{5-1}$ . As variáveis estudadas foram: pH, temperatura, agitação, concentração farinha de soja e concentração do glicerol, melhores resultados foram obtidos em pH 6,0, com a menor concentração de glicerol testada e maior concentração de farinha de soja. Segundo Chen et al. (2002) a utilização de derivados da soja como componentes do meio de cultura para a produção de AC é importante pois essa fonte de nitrogênio contém em sua composição aminoácidos como a arginina que é precursor do AC.

Maranezi et al. (2005) estudaram meios de cultivo contendo glicerol e diferentes tipos (soja, milho e girassol) e concentrações de óleos vegetais para a produção de AC por *S. clavuligerus*. Resultados obtidos mostraram o glicerol foi consumido rapidamente para o crescimento celular durante a tropofase, enquanto que os lipídios foram metabolizados lentamente para produzir glicerol e ácido graxo para a manutenção das células durante a idiofase, Em presença do glicerol a produção do AC foi notavelmente melhorada. Segundo esses autores o glicerol é a fonte de carbono preferida para o crescimento microbiano e atua como precursor da molécula do AC. Um estudo sobre as exigências nutricionais e estratégias de alimentação para a produção de AC foi realizado por Saudagar e Singhal (2007), a fermentação foi alimentada com glicerol, arginina e treonina em todos os casos houve um aumento da produção, a adição do glicerol ao meio de cultivo gerou um aumento de 18% na produção de AC quando comparado com o controle. Demonstrando a importância desta fonte de carbono para a produção de AC.

### *1.5.3 Estabilidade do Ácido Clavulânico*

A estrutura química do AC, assim como de outros compostos  $\beta$ -lactâmicos, é quimicamente instável, pois possui um átomo do grupo carbonila do anel  $\beta$ -lactâmico susceptível ao ataque por íons hidróxido OH<sup>-</sup> ou H<sup>+</sup> da molécula de água (Santos et al., 2009). Vários estudos sobre a estabilidade do AC puro ou presente no líquido fermentado vêm sendo investigados por diferentes grupos de pesquisadores, tendo como objetivo a diminuição de perdas e maior rendimento nos processos fermentativos para a produção do AC.

Haginaka et al. (1981) estudaram a estabilidade do AC em diferentes tampões, a uma temperatura constante de 35 °C com força iônica ajustada para  $\mu=0,5$  e em valores de pH que variaram de 3,15 a 10,10. A degradação do AC seguiu uma cinética de pseudo-primeira ordem fortemente dependente do pH, a constante de velocidade de degradação foi maior com o aumento da concentração do tampão, sendo portanto, muito influenciada pela catálise causada pelos sais do tampão utilizados para manter o pH constante. A máxima estabilidade do AC foi obtida em pH 6,39.

Bersanetti et al. (2005) estudaram a cinética de degradação do AC puro e do AC presente no caldo fermentado em temperaturas que variaram de 10 a 40°C em pHs 6,2 e 7,0. A degradação do AC mostrou uma cinética de pseudo-primeira ordem, além disso, esses autores verificaram que as constantes de degradação do AC em soluções aquosas são menores em relação às soluções obtidas do meio de fermentação, isto devido à presença de outros componentes do meio, tal como compostos que contêm amônio.

Outro estudo sobre a estabilidade do AC foi realizado por Santos et al., (2009), em uma primeira etapa de experimentos a estabilidade do AC foi determinada em diferentes valores de pH (4,0-8,0) e temperaturas (20-45°C), e numa etapa subsequente a estabilidade foi



determinada a pH e temperatura constantes, mas variando a força iônica, por adição de diferentes sais (NaCl, CaCl<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub> e Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) em concentrações de 0,1 ou 0,5M. A maior estabilidade do AC foi observada a 20°C em pH 6,0-7,2, em todos os experimentos em que houve adição de sais ocorreu um aumento da instabilidade do AC. A instabilidade do AC é portanto, um importante fator a ser contornado para sua produção industrial.

#### ***1.5.4 Extração e Purificação do Ácido Clavulânico***

Industrialmente o AC é produzido por fermentação de *S. clavuligerus*, o líquido obtido desta fermentação passa por inúmeras etapas para a extração e purificação do AC, tais como: filtração e centrifugação para a separação das células do líquido fermentado, técnicas de extração e adsorção, para posterior purificação (Hirata et al., 2009). Um dos métodos utilizados para a extração do AC é a técnica de extração líquido-líquido por solventes orgânicos. Após a remoção das células adiciona-se ácido ao líquido metabólico para obter um pH entre 2-3 sob agitação. Diferentes solventes têm sido empregados nesse processo, podemos citar: acetato de etila, n-butanol, metilisobutilcetona, acetato de n-butila, entre outros (Oliveira et al., 2009). O ácido clavulânico presente na fase orgânica é então novamente extraído com uma nova fase aquosa de pH neutro, para esta segunda extração são utilizadas soluções de bicarbonato de cálcio, carbonato de cálcio, tampão fosfato ou água. O líquido obtido é concentrado à pressão reduzida e liofilizado.

Para a purificação do produto obtido nas etapas de extração várias técnicas já foram aplicadas, tais como, adsorção em resina de troca iônica, reações de esterificação e precipitação. Segundo Mayer e Decker (1996), tais métodos de separação são uma ótima opção para a extração e purificação de compostos de baixo peso molecular diluídos em soluções, a exemplo dos antibióticos produzidos por fermentação. Entretanto, para o AC, os rendimentos relatados

com troca iônica, operações de adsorção e líquido-líquido são geralmente de baixos, visto que, o AC apresenta elevada velocidade de degradação em temperaturas acima de 30°C, em regiões básicas (pH > 7,5) e ácidas (pH < 4,5).

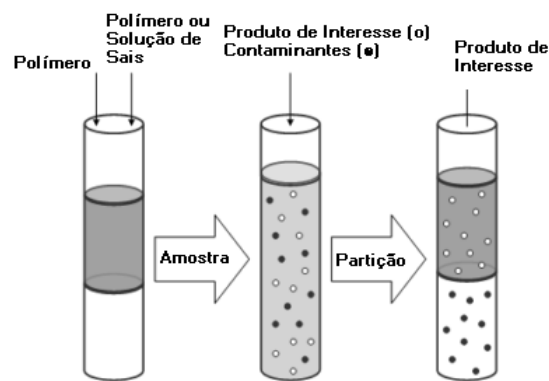
O Sistema de Duas Fases Aquosas (SDFA) é um método alternativo para a purificação do AC no caldo fermentado e vêm sendo relatado na literatura por alguns autores. Videira e Aires-Barros (1994) estudaram a extração líquido-líquido do AC, presente no líquido fermentado, utilizando SDFA em sistemas formados por PEG e sais de fosfatos. Os autores observaram que nas condições testadas o clavulanato de potássio mostrou afinidade pela fase superior rica em PEG com altos valores de recuperação (90-99%). Silva et al. (2009) estudaram os parâmetros envolvidos na purificação do AC em SDFA PEG – fosfatos. Os autores estudaram a influência da massa molar do PEG (MPEG), pH, temperatura, comprimento da *tie-line* (TLL) e volume das fases (rTLL), e obtiveram valores de recuperação próximos a 100%.

Silva et al. (2011) utilizou o SDFA como um método para extração e pré-purificação do AC presente no caldo fermentado por *Streptomyces clavuligerus* e adicionado de aminoácidos. O AC presente na fase rica em PEG foi posteriormente purificado por adsorção de troca iônica, a purificação foi de 100% em relação aos aminoácidos presentes no meio. Tais resultados evidenciam o potencial deste método (SDFA) para a extração e pré-purificação do AC presente no caldo fermentado de forma integrada.

## **I.6 Extração líquido-líquido em sistema de duas fases aquosas (SDFA)**

O fenômeno de separação de fases foi observado pela primeira vez pelo holandês microbiologia Martinus Willem Beijerinck. Este pesquisador constatou que, em determinadas concentrações misturas contendo gelatina, agár e água, formavam duas fases aquosas, sendo a fase superior rica em gelatina e a inferior rica em agár. No entanto, apenas no ano de 1950,

Albertsson utilizando o polímero polietilenoglicol (PEG) com sais de de fosfato e água observou a formação de duas fases. Albertsson também observou que os sistemas formados eram constituídos em grande parte por água (% m/m) e que biomoléculas adicionadas a esses sistemas bifásicos foram capazes de se distribuir desigualmente entre as fases. (Albertsson, 1986) (Figura 9). Desde de então os SDFA têm sido amplamente explorados para processar diferentes fontes biológicas visando a recuperação de diferentes biomolécula.

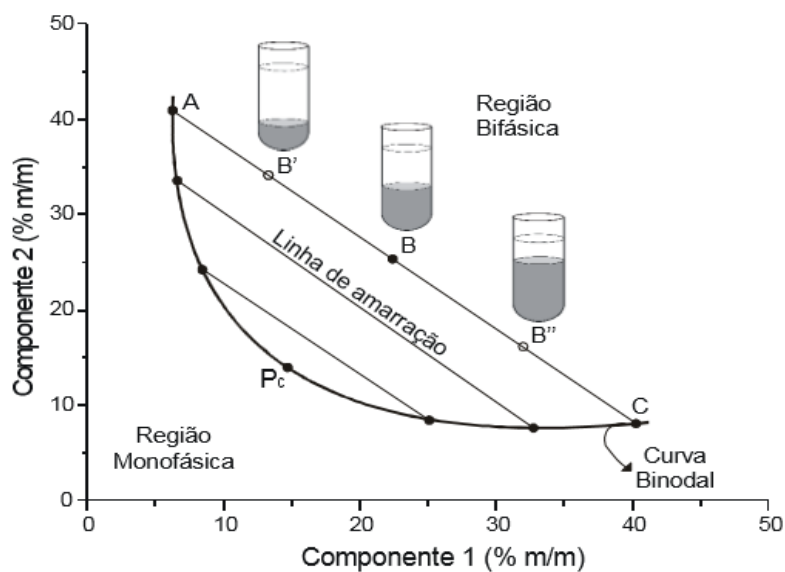


**Figura 9.** Esquema da purificação de um produto de interesse utilizando sistema de duas fases aquosas (SDFA) (Adaptado de Benavides et al., 2008).

O SDFA é formado quando compostos hidrófilos, tais como alguns tipos de polímeros (polietileno-glicol, dextrana, poli-propileno-glicol, etc) e sais (fosfatos, sulfatos, citratos, etc) são combinados em certas concentrações críticas, resultando na formação de duas fases hidrófilas (Benavides et al., 2008).

Os SDFA podem ser representados por um digrama de fases, como pode ser visualizado na Figura 10, no qual a ordenada representa a composição em massa da molécula que apresenta maior concentração na fase superior (PEG) e a abscissa representa a molécula de maior concentração na fase inferior (Sal). As concentrações representadas por pontos localizados acima da curva de equilíbrio ou binodal, formarão duas fases, e as concentrações cuja os pontos

localizam-se abaixo da curva binodal apresentam-se como monofásicos (Pessoa Jr e Kilikian, 2005). Desta forma, a curva de binodal representa o limite que separa a região monofásica da região bifásica no diagrama de fases. As linhas são chamadas “*tie-lines*” ou linhas de amarração e qualquer ponto sobre ela representa um sistema com a mesma composição, porém com diferentes volumes das fases superior e inferior. O Ponto crítico ( $P_c$ ) é aquele sobre o qual as composições e os volumes das fases superior e inferior são iguais, os sistemas de composição próximas a este ponto são mais instáveis e devem ser evitados, pois pequenas diluições no sistema podem deslocá-lo para a região monofásica (Pessoa Jr e Kilikian, 2005).



**Figura 10.** Representação geral de um diagrama de fases de um SDFa. (Adaptado de Raja et al., 2011)

Desta forma, a separação das fases para cada sistema muda de acordo para os polímeros (peso molecular e concentração) e do sal (composição e concentração) adicionado. Sendo o conhecimento da curva binodal, essencial quando se trabalha com sistemas aquosos bifásicos (Mazzola et al., 2008). Para qualquer SDFa, a presença do meio contendo as moléculas a serem extraídas modifica a posição da curva de equilíbrio, pois altera as características do meio,

todavia, a curva deve ser conhecida para que se eleja uma condição de trabalho na qual ocorra formação de duas fases (Pessoa Jr e Kilikian, 2005).

Existem três tipos principais de SDFA de acordo com sua constituição: (1) polímero-sal, (2) polímero-polímero, e (3) SDFA constituídos de compostos alternativos, por exemplo, óxido de etileno e copolímeros de óxido de propileno (EOPO), amido hidroxilpropil (HPS), ácido iminoadiacetic (IAA), etc (Benavides et al., 2008).

De acordo com Hustedt et al. (1985) alguns fatores influenciam a partição das moléculas nos SDFA, dentre eles estão:

- (1) Tipo de polímeros;
- (2) Massa molar e concentração dos polímeros;
- (3) Comprimento da linha de amarração (função da concentração dos componentes de cada fase do sistema);
- (4) Tipo e concentração de sais adicionados;
- (5) pH; e
- (6) Temperatura.

Quanto maior a massa molar do polímero, menor será a concentração necessária para a separação de fases, ou seja, visto que, com o aumento da concentração do polímero, as diferenças de densidade, índice de refração e viscosidade aumentam entre as fases. Deslocando a curva de equilíbrio no sentido da região monofásica (Pessoa Jr e Kilikian, 2005; Raja et al., 2011).

Nos sistemas formados por PEG/Sal, o particionamento de biomoléculas é governada por efeito de volume exclusão (fase rica em PEG) e/ou efeito salting-out (fase rica em sal). Os sistemas constituídos com polímeros de alto peso molecular ou concentração elevada e alta

concentração de sais, provavelmente, irá resultar no particionamento da biomolécula para a interfase devido ao efeitos de volume excluído e salting-out combinados (Babu et al., 2008).

Em sistemas de PEG/Sal, alguns fatores levam ao aumento do Coeficiente de Partição  $K$ : Dado pela equação:  $K=C_{\text{PEG}}/C_{\text{SAL}}$ .

- Quando o peso do PEG é baixo, a tensão interfacial entre as fases é baixa, levando a um aumento do coeficiente de partição;
- Em elevadas concentrações do sal, há um aumento da força iônica na fase inferior, que leva a uma melhora da partição da molécula para a fase superior, rica em PEG.
- Se a concentração de PEG é elevada, o número de unidades de polímero envolvidos no particionamento da biomolécula também aumenta e, portanto, mais biomoléculas participarão para a fase rica em PEG, devido a uma interação hidrofoba entre a biomolécula e PEG (Raja et al., 2011)

A influência da carga da biomolécula na partição pode ser estudada medindo-se o coeficiente de partição em vários valores de pH, pois, como se sabe, a carga de biomoléculas depende do pH. Contudo, esta influência da carga da biomolécula depende muito do tipo de sal presente no sistema, uma vez que diferentes sais dão origem a diferentes potenciais elétricos entre as fases. Mudanças no pH podem também induzir mudanças conformacionais na estrutura das proteínas, causando mudança em seus comportamentos de separação. Em condições extremas de pH é possível que ocorra a desnaturação das proteínas. Geralmente, a partição de proteínas desnaturadas é diferente da partição das mesmas proteínas na forma nativa, o que pode ser atribuído não só a maior área superficial da forma desnaturada, mas também ao fato da superfície exposta desta ser muito mais hidrofóbica (Albertsson, 1986).

Pesquisadores relatam que em altos valores de pH, moléculas com carga negativa, particionam preferencialmente para a fase superior e o coeficiente de partição aumenta, isto pode ocorrer devido as interações eletrostáticas entre a biomolécula e as unidades de PEG (Raja et al., 2011).

As propriedades termodinâmicas de entalpia e entropia dos sistemas devem ser analisadas para verificar o efeito da temperatura sobre a separação de fases. A interação entre os íons do sal e o polímero, na formação do SDFA, ocorre com absorção de energia, ou seja, esta interação é endotérmica. Assim, o aumento da temperatura favorece a formação dos produtos e aumenta a intensidade da interação Sal-PEG. Desta forma, o favorecimento da interação Sal-PEG levaria à diminuição na quantidade de sal a ser adicionado ao sistema para que ocorresse a formação do sistema aquoso bifásico. Entretanto, o aumento da temperatura leva à diminuição da quantidade de sal e conseqüente aumento da região bifásica do diagrama de equilíbrio (Silva e Loh, 2006; Carvalho, 2007).

O desenvolvimento de bioprocessos utilizando SDFA é limitada pela má compreensão e caracterização dos efeitos provocados pelos diferentes parâmetros do sistema na partição de um composto em particular. Geralmente, o comportamento de partição dos produtos alvo e contaminantes sob diferentes parâmetros do sistema, por exemplo, o comprimento da linha de amaração (TLL), relação de volume de fase ( $V_R$ ), pH, o carregamento da amostra, entre outros, é experimentalmente avaliada como um primeiro passo no desenvolvimento do processo (Benavides et al., 2008).

A separação da molécula a ser estudada e os contaminantes presentes na amostra, decorre das diferentes solubilidades apresentadas por esses solutos, em cada uma das fases do sistema, ou seja em SDFA cuja a molécula de interesse possui afinidade pela fase rica em PEG,

ocorrerá aumento de pureza caso os contaminantes apresentem maior solubilidade na fase inferior (Pessoa Jr e Kilikian, 2005).

A purificação de biomoléculas utilizando S DFA tem demonstrado inúmeras vantagens, uma vez que a natureza aquosa das fases coexistentes, e o curto de tempo de separação das fases impedem a desnaturação ou perda da atividade das moléculas biológicas. Além disso, os processos utilizando S DFA possuem custos relativamente baixos, facilidade no aumento de escala, e podem ser utilizados em operação contínua. Atualmente, uma série de proteínas são purificadas a um nível industrial utilizando S DFA (Cláudio et al., 2012).

Recentemente, sistemas de duas fases aquosas tem se tornado uma atrativa tecnologia de separação e purificação para numerosas biomoléculas como: proteínas (Raja e Murty, 2013), células e organelas celulares (Edahiro et al., 2005; Morre e Morré, 2000), material genético (Trindade et al., 2005), moléculas de baixo peso molecular (Cisneros et al., 2004) e até nanopartículas biológicas (Benavides et al., 2006). Os S DFA têm mostrado ser uma opção valiosa para o processamento e “*downstream*” de produtos biofarmacêuticos (Azevedo et al., 2009; Rosa et al., 2010).

### **I.7 Fermentação extrativa utilizando sistema de duas fases aquosas**

A fermentação extrativa ou recuperação do produto *in situ* proporciona uma solução técnica para ultrapassar as limitações de inibição pelo produto e baixa produtividade volumétrica característica de processos biotecnológicos. O conceito, tal como, o nome indica, o processo de produção e recuperação de produtos de interesse ocorre simultaneamente (Banik et al., 2003).

Na fermentação extrativa utilizando S DFA, através de uma manipulação apropriada do sistema, as células são imobilizadas em uma das fases do sistema, enquanto que, o produto



desejado tende a particionar para a fase oposta. Uma vez que os processos de fermentação e separação do produto ocorrem simultaneamente, uma compreensão conceitual dos mecanismos subjacentes é essencial para a criação de sistemas de sucesso.

De acordo com Banik et al. (2003) os SFA podem ser utilizados com sucesso para a fermentação extrativa desde que atendam as seguintes condições:

- (1) os constituintes das fases (de polímero e/ou sais), na concentração utilizada, não deve ser tóxico ou inibidor para as células;
- (2) os constituintes da fase não devem ser utilizados como um substrato para as células;
- (3) a natureza físico-química do sistema de fases, como por exemplo: a integridade dos polímeros, reologia, entre outros, não deve ser afetada pelo processo de fermentação;
- (4) as células e o substrato limitante devem particionar total ou predominantemente em para uma das fases.
- (5) Os constituintes dos meios de cultivo tais como como o amido, glicerol, sais minerais, etc, não devem afetar o comportamento de forma drástica, e
- (6) o sistema deverá ser rentável em termos de reciclabilidade de polímero e/ou sal.

O processo de fermentação extrativa vêm sendo utilizado com sucesso para a extração de diversas biomoléculas, como pode ser observado na Tabela 3.

**Tabela 3.** Produtos de interesse biotecnológico produzidos e extraídos simultaneamente por Fermentação Extrativa.

<b>Produto</b>	<b>Organismo</b>	<b>SDFa</b>	<b>Referências</b>
Subtilina	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	PEG/Fosfato	Kuboi et al., 1994
Pectinases	<i>Polyporus squamosus</i>	PEG/Dextrana	Antov e Pericin, 2001
Hidrolases	<i>Bacillus licheniformis</i>	PEG/Dextrana	Ivanova et al., 2001
Protease alcalina	<i>Bacillus cereus</i>	PEG/Fosfato	Rai, 2010
Lipase extracelular	<i>Burkholderia pseudomallei</i>	PEG/Dextrana	Ooi et al., 2010
Carotenóides	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	PEG/Dextrana	Chavez-Santoscoy et al., 2010
Ácido Clavulânico	<i>Streptomyces</i> sp. UFPEDA	PEG/Fosfato	Viana Marques et al., 2010
Fosfatase alcalina	<i>Bacillus licheniformis</i>	PEG/Dextrana	Pandey et al., 2011
Lipase	<i>Burkholderia cepacia</i>	(EOPO)	Show et al., 2011

## I.7 REFERÊNCIAS

- ALBERTSSON, P.A. Partition of Cell Particles and Macromolecules 3rd edn. New York: Wiley-Interscience, ISBN 0471828203, 1986.
- AMBLER, R. The structure of  $\beta$ -lactamases. **Philos Trans R Soc**, London Ser B, v. 289, p. 321-331, 1980
- ANTOV M. G., PERICIN D. M. Production of pectinases by *Polyporus squamosus* in aqueous two-phase system. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 28, p. 467–472, 2001.
- ATTA, H. M.; HAROUN, B. M.; KHALIFA, M. A. Physico-chemical characteristics of vernamycin-A antibiotic biosynthesis by *Streptomyces* SP-AZ-SH-29. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 15, p. 247-255, 2011.
- AZEVEDO, A. M., ROSA, P. A. J., FERREIRA, I. F., AIRES-BARROS, M. R., Chromatography-free recovery of biopharmaceuticals through aqueous two-phase processing. **Trends in biotechnology**, v. 27, n. 4, p. 240-247, 2009.
- BABU B. R., RASTOGI N. K., RAGHAVARAO K. S. M. S., (2008) Liquid-liquid extraction of bromelain and polyphenol oxidase using aqueous two-phase system. **Chem. Eng. Process**, v. 47, p. 83–89, 2008.
- BANIK R. M., SANTHIAGU A., KANARI B., SABARINATH C., UPADHYAY S. N. Review: Technological aspects of extractive fermentation using aqueous two-phase systems. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 19, p. 337–348, 2003.
- BEAMAN B. L e BEAMAN L. *Streptomyces malasyensis* Species: Host-Parasite Relationships. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 7, n. 2, p. 213-264, 1994.

BENAVIDES J., AGUILAR O., LAPIZCO-ENCINAS B. H., RITO-PALOMARES M. Review: Extraction and Purification of Bioproducts and Nanoparticles using Aqueous Two-Phase Systems Strategies. **Chem. Eng. Technol.**, v. 31, n. 6, p. 838–845, 2008.

BENAVIDES J., MENA J. A., CISNEROS-RUIZA M., OCTAVIO T. RAMÍREZ O. T., PALOMARES L. A., RITO-PALOMARES M. Rotavirus-like particles primary recovery from insect cells in aqueous two-phase systems. **Journal of Chromatography B**, v. 842, p. 48–57, 2006.

BENAVIDES J., RITO-PALOMARES M. Review: Practical experiences from the development of aqueous two-phase processes for the recovery of high value biological products. **J Chem Technol Biotechnol**, v. 83, p. 133–142, 2008.

BERSANETTI P. A., ALMEIDA R. M. R. G., BARBOZA M., ARAUJO M. L. G. C., HOKKA C. O. Kinetic studies on clavulanic acid degradation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 23, p. 31–36, 2005.

BRENNER D. J.; KRIEG N. R.; STALEY J. T. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol.2. 2 Ed. Editora Springer, 2008.

BROWN A. G., BUTTERWORTH D., COLE M., HANSCOMB G., HOOD J. D., READING C. (1976) Naturally-occurring b-lactamase inhibitors with antibacterial activity. **The Journal of Antibiotics**, v. 29, n. 6, p. 5-6, 1976.

BUSH, K., JACOBY, G. E MEDEIROS, A. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 39, p. 1211-1233, 1995.

BUSSARI, B. Production of Cephamicin C by *Streptomyces clavuligerus* NT4 using solid-state fermentation. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 35, p. 49-58, 2008.

CARVALHO M. M. Estudo de equilíbrio de fases para Sistemas Aquosos Bifásicos compostos por Poli (etileno glicol) 6000, sulfato de cobre ou sulfato de zinco e água em função da temperatura. Dissertação. Universidade Federal de Viçosa. 2007.

CHAVEZ-SANTOSCOY A., BENAVIDES J., VERMAAS W., RITO-PALOMARES M. Application of Aqueous Two-Phase Systems for the Potential Extractive Fermentation of Cyanobacterial Products. **Chem. Eng. Technol**, v. 33, n. 1, p. 177–182, 2010.

CHENG CHEN K., HUIN LINA Y., YIIWUA J., CHWUN JOHN HWANG S. Enhancement of clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus* with ornithine feeding. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, p. 152–156, 2002.

CISNEROS, M., BENAVIDES, J., BRENES, C.H. and RITO-PALOMARES, M. Recovery in aqueous two-phase systems of lutein produced by the green microalga *Chlorella protothecoides*. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 807, n. 1, p. 105-110, 2004.

CLÁUDIO A. F. M., FERREIRA A. M., FREIRE C. F. R., SILVESTRE A. J. D., FREIRE M. G., COUTINHO J. P. Optimization of the gallic acid extraction using ionic-liquid-based aqueous two phase systems. **Separation and purification Technology**. 97, 142-149, 2012.

DIAS D. J. A. Estudo dos Principais Mecanismos de Resistência aos Antibióticos  $\beta$ -lactâmicos em Bactérias Patogénicas de Gram negativo. Dissertação, Universidade Nova de Lisboa, Faculdade de Ciências e Tecnologia, 2009.

DINESH K., MAHARJAN S., DHAKAL D., YOO J. C., SOHN J. K. Effect of Different Biosynthetic Precursors on the Production of Nargenicin A1 from Metabolically Engineered *Streptomyces malasyensis* sp. CS682. **J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 22, n. 8, p. 1127–1132, 2012.

EBRAHIM G. J. J. Bacterial resistance to antimicrobials. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 56, p. 141-143, 2010.

EDAHIRO J., YAMADA M., SEIKE S., KAKIGI Y., MIYANAGA K., NAKAMURA M., KANAMORI T., SEKI M. Separation of Cultured Strawberry Cells Producing Anthocyanins in Aqueous Two-Phase System. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 100, n. 4, p. 449–454, 2005

ELSON S. W., OLIVER R. S. Studies on the biosynthesis of clavulanic acid I. Incorporation of 13 C-labeled precursors. **J Antibiotics**, v. 31 p. 586–592, 1978.

GUIMARÃES D. O., MOMESSO L. S., PUPO M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Quim. Nova**, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.

HAGINAKA J., NAKAGAWA T., UNO T. Stability of clavulanic acid in aqueous solutions, **Chem. Pharm. Bul**, v. 29, p. 3334–3341, 1981.

HEMASHENPAGAM N. Purification of secondary metabolites from soil actinomycetes. **International Journal of Microbiology Research**, v. 3, n. 3, p. 148-156, 2011.

HIRATA D. B., OLIVEIRA J. H. H. L., LEÃO K. V., RODRIGUES M. I., FERREIRA A. G., GIULIETTI M., BARBOZA M., HOKKA C. O. (2009) Precipitation of clavulanic acid from fermentation broth with potassium 2-ethyl hexanoate salt. **Separation and Purification Technology**. v. 66, p. 598–605, 2009.

HOHMANN, C. Caboxamycin, a new antibiotic of the benzoxazole family produced by the deep-sea strain *Streptomyces* sp. NTK 937. **The Journal of Antibiotics**, p. 1-6, 2009.

HOSHINO Y., MUKAI A., YAZAWA K., UNO J., ISHIKAWA J., ANDO A., FUKAI T. and MIKAMI Y. Transvalencin A, a Thiazolidine Zinc Complex Antibiotic Produced by a Clinical Isolate of *Streptomyces malasyensis transvalensis* I. Taxonomy, Fermentation, Isolation and Biological Activities. **The Journal of Antibiotics**, v. 57, n. 12, p. 797-802, 2004.

HUSTEDT H., KRONER K. H., MENGE U., KULA M. R. (1985) Protein recovery using two-phase systems. **Trends in Biotechnology**, v. 3, n. 6, p. 139-144, 1985.

ISHIKAWA J, YAMASHITA A, MIKAMI Y, HOSHINO Y, KURITA H, HOTTA K, SHIBA T, HATTORI M. (2004) The complete genomic sequence of *Streptomyces malasyensis farcinica* IFM 10152. **Proc Nat Acad Sci USA**, v. 10, p. 14925–14930, 2004.

IVANOVA V., DRAGOMIR YANKOV D., KABAIVANOVA L., PASHKOULOV D. (2001) Simultaneous biosynthesis and purification of two extracellular *Bacillus* hydrolases in aqueous two-phase systems. **Microbiol. Res**, v. 56, p. 19-30. 2001.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; HEINS-VACCARI, E. M.; MELO, N. T. Tratado de Micologia Médica. 9. ed. São Paulo: Sarvier Editora de Livros Médicos, 2002.

KIESER, T. Practical *Streptomyces* Genetics. John Innes Foundation, Norwich, England, 2002.

KIM S. H, LIM E. J., LEE S. O., LEE J. D., LEE T. H. Purification and characterization of biosurfactants from *Streptomyces malasyensis* sp. L-417. **Biotechnol. Appl. Biochem**, v. 31, p. 249–253, 2000.

KUBOI R., MARUKI T., TANAKA H., KOMASAWA I. Fermentation of *Bacillus subtilis* ATCC 6633 and Production of Subtilin in Polyethylene Glycol/Phosphate Aqueous Two-Phase Systems. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 78, n. 6, p. 431-436, 1994.

MARANESI G. L., BAPTISTA-NETO A., HOKKA C. O., BADINO A. C. Utilization of vegetable oil in the production of clavulanic acid by *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064 **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 21, p. 509–514, 2005.

MAYER A. F., DECKWER W. D. Simultaneous production and decomposition of clavulanic acid during *Streptomyces clavuligerus* cultivations. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 45, p. 41–4, 1995.

MAZZOLA P. G., LOPES A. M.,<sup>1</sup> HASMANN F. A., JOZALA A. F., PENNA T. C. V., MAGALHAES P. O., RANGEL-YAGUI C. O., PESSOA JR A. Review Liquid–liquid extraction of biomolecules: an overview and update of the main techniques. **J Chem Technol Biotechnol**, v. 83, p. 143–157, 2008.

MENDES R. E., CASTANHEIRA M., PIGNATARI A. C. C., GALES A. C. (2006) Metallo- $\beta$ -lactamases. **J Bras Patol Med Lab**, v. 42, n. 2, p. 103-113, 2006.

MIKAMI Y. Biological Work on Medically Important *Streptomyces malasyensis* Species. **Actinomycetologica**, v. 21, p. 46–51, 2007.

MOOSDEEN F. Impact of  $\beta$ -lactamases on the clinical use of structure. In: Viewpoints in Medicine, Countering Resistance due to  $\beta$ -lactamases. **Worthing: Cambridge Medical European respiratory tract isolates to trovafloxacin ciprofloxacin Publications**, p. 6–11, 1996.



MORRÉ D. M., MORRE D. J. Aqueous two-phase partition applied to the isolation of plasma membranes and Golgi apparatus from cultured mammalian cells. **J Chromatogr B**, v. 743, p. 377–387, 2000.

MOTA R. P., SILVA K. P. C., FREITAS M. F. L., PORTO W. J. N., SILVA L. B. G. Artigo de Revisão: Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição a multirresistência bacteriana. **Braz J vet Res anim Sci**, São Paulo, v. 42, n. 6, p. 465-470, 2005.

MUKAI A, FUKAI T, MATSUMOTO Y, ISHIKAWA J, HOSHINO Y, YAZAWA K, HARADA K, MIKAMI Y. Transvalencin Z, a New Antimicrobial Compound with Salicylic Acid Residue from *Streptomyces malasyensis* transvalensis IFM 10065. **J. Antibiot**, v. 59, n. 6, p. 366–369, 2006.

MURRAY P., ROSENTHAL, K. E PEALLER, M. Medical Microbiology. Fifth edition. Elsevier Mosby, USA, 2005.

NICHOLSON N. H., BAGGALEY K. H., CASSELS R., DAVISON M., ELSON S. W., FULSTON M., TYLER J. W., WORONIECKI S. R. Evidence that the immediate biosynthetic precursor of clavulanic acid is its N-aldehyde analogue. **J Chem Soc Chem Commun**, p. 1281–1282, 1994.

OGUNMWONYI I. H., MAZOMBA N., MABINYA L., NGWENYA E., GREEN E., AKINPELU D. A. Studies on the culturable marine actinomycetes isolated from the Nahoon beach in the Eastern Cape Province of South Africa. **Afr J Microbiol Res**, v. 4, n. 21, p. 2223-2230, 2010.

OHNISHI, Y. Genome Sequence of the Streptomycin-Producing Microorganism *Streptomyces griseus* IFO 13350. **Journal of Bacteriology**, p. 4050-4060, 2008.

OLIVEIRA A. C., SILVA R. S. Desafios do cuidar em saúde frente à resistência bacteriana: uma revisão. **Revista Eletrônica de Enfermagem**, v. 10, n. 1, p. 189-197, 2008. Available from: <http://www.fen.ufg.br/revista/v10/n1/v10n1a17.htm>.

OLIVEIRA J. H. H. L., GRANATO A. C., HIRATA D. B., HOKKA C. O., BARBOZA M. Ácido Clavulânico e Cefamicina C: uma perspectiva da biossíntese, processos de isolamento e mecanismo de ação. **Quim. Nova**, v. 32, n. 8, p. 2142-2150, 2009.

OOI C. W., HII S. L., KAMALA S. M. M., ARIFF A., LINGA T. C. Extractive fermentation using aqueous two-phase systems for integrated production and purification of extracellular lipase derived from *Burkholderia pseudomallei*. **Process Biochemistry**, Doi:10.1016/j.procbio.2010.07.014, 2010.

ORTIZ, S. C. A., HOKKA, C. O., BADINO, A. C. Utilization of soybean derivatives on clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus*, **Enzyme Microb Technol**, v. 40, p. 1071-1077, 2007.

PANDEY S. K., BANIK R. M. Extractive fermentation for enhanced production of alkaline phosphatase from *Bacillus licheniformes* MTCC 1483 using aqueous two-phase systems. **Bioresource Technonology**, v. 102, p. 4226-4231, 2011.

PEREIRA, J.F.B., SANTOS, V.C., JOHANSSON, H.-TEIXEIRA, J.A.C., PESSOA JR., A., A stable liquid-liquid extraction system for clavulanic acid using polymer-based aqueous two-phase systems. **Separation and Purification Technology**, v. 98, p. 441-450, 2012.

PESSOA Jr., A.; KILIKIAN, B. V. (coordenadores) Purificação de Produtos Biotecnológicos. 1ª ed. São Paulo: Manole, 2005.

PICÃO, R. C., GALES, A. C.  $\beta$ -Lactamases de Espectro Ampliado (ESBL) em *Pseudomonas aeruginosa*: Pesadelo ou só Imaginação? **Prática Hospitalar**, v. 9, p. 49, 2007.

PROCÓPIO, R. E. L., SILVA, I. R., MARTINS, M. K., AZEVEDO, J. L., ARAÚJO, J. M. Antibiotics produced by *Streptomyces*. **Braz J Infect Dis**, v. 16, n. 5, p. 466–471, 2012.

RAI M. P. Enhanced Production of Laundry Detergent Compatible Bacillus Protease in Aqueous Two-Phase System. *International Journal of Biotechnology and Biochemistry*, v. 6, n. 5, p. 811–817, 2010.

RAJA S., MURTY V. R. Research Article: Optimization of Aqueous Two-Phase Systems for the Recovery of Soluble Proteins from Tannery Wastewater Using Response Surface Methodology. **Journal of Engineering**, ID 217483, 10 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2013/217483>, 2013.

RAJA S., MURTY V. R., THIVAHARAN V., RAJASEKAR V., RAMESH V. (2011) Aqueous Two Phase Systems for the Recovery of Biomolecules – A Review. **Science and Technology**, v. 1, n. 1, p. 7-16, 2011.

RAJA, A.; PRABAKARANA, P. Actinomycetes and Drug - An Overview. **American Journal of Drug Discovery and Development**, v. 1, n. 2, p. 75-84, 2011.

RAVIKUMAR S, INBANESON S. J., UTHIRASELVAM M. , PRIYA S. R., RAMU A., BANERJEE M. B. Diversity of endophytic actinomycetes from Karangkadu mangrove ecosystem and its antibacterial potential against bacterial pathogens. **J Pharm Res.**, v. 4, n. 1, p. 294-29, 2011.

RICHMOND W. Preparation and Properties of a Cholesterol Oxidase from *Streptomyces malasyensis* sp. and Its Application to the Enzymatic Assay of Total Cholesterol in Serum. **CLIN. CHEM.**, v. 19, n. 12, 1350-1356, 1973.

ROSA, P. A. J., FERREIRA, I. F., AZEVEDO, A. M., AIRES-BARROS, M. R. Aqueous two-phase systems: A viable platform in the manufacturing of biopharmaceuticals. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 16, p. 2296-2305, 2010.

SANTOS V. C., PEREIRA J. F. B., HAGA R. B., RANGEL-YAGUIC C. O., TEXEIRA J. A. C., CONVERTI A., PESSOA-Jr A. P. Stability of clavulanic acid under variable pH, ionic strength and temperature conditions. A newkinetic approach. **Biochemical Engineering Journal**, v. 45, p. 89–93, 2009.

SATEESH V., NAIKPATIL RATHOD J. L. Selective isolation and antimicrobial activity of rare actinomycetes from mangrove sediment of Karwar. **Journal of Ecobiotechnology**, v. 3, n. 10, p. 48-53, 2011.

SAUDAGAR P. S., SINGHAL R. S. Optimization of nutritional requirements and feeding strategies for clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus*. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 2010–2017, 2007.

SAUDAGAR P. S., SURVASE S. A., SINGHAL R. S. Clavulanic acid: A review. **Biotechnology Advances**, v. 26, p. 335–351, 2008

SHARID, M., SOBIA, F., SINGH, A., MALIK, A., KHAN, H. M., JONAS, D., HAWKEY, P. M. Review article- Beta-lactams and Beta-lactamase-inhibitors in current- or potential- clinical practice: A comprehensive update. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 35, n. 2, p. 81–108, 2009.

SHOW P. L., TAN C. P., ANUAR M. S., ARIFF A., YUSOF Y. A., CHEN S. K., LING T. C. Extractive fermentation for improved production and recovery of lipase derived from *Burkholderia cepacia* using a thermoseparating polymer in aqueous two-phase systems. **Bioresource Technology**, doi:10.1016/j.biortech.2011.09.131., 2011.

SIK CHO S, SOHNG J. K., LEE H. J., PARK S. J., SIMKHADA J. R., YOO J. C., Quantitative Analysis of Nargenicin in *Streptomyces malasyensis* sp. CS682 Culture by High Performance Liquid Chromatography. **Arch Pharm Res**, v. 32, n. 3, p. 335-340, 2009.

SILVA C. S., BOVAROTTI E., RODRIGUES M. I., HOKKA C. O., BARBOZA M. Evaluation of the effects of the parameters involved in the purification of clavulanic acid from fermentation broth by aqueous two-phase systems. **Bioprocess Biosyst Eng.**, v. 32, p. 625–632, 2009.

SILVA K. C., LINCOPAN N. Epidemiologia das betalactamases de espectro estendido no Brasil: impacto clínico e implicações para o agronegócio. **J Bras Patol Med Lab.**, v. 48, n. 2, p. 91-99, 2012.

SILVA L. H. M., LOH W. Sistemas Aquosos Bifásicos: Fundamentos e Aplicações para Partição/Purificação de Proteínas. **Quim. Nova**, v. 29, n. 6, p. 1345-1351, 2006.

SILVEIRA G. P., NOME F., GESSER J. C., SÁ M. M. Estratégias utilizadas no combate a resistência bacteriana. **Quim. Nova**, v. 29, n. 4, p. 844-855, 2006.

SONG, J. Y., JENSEN, S. E., LEE, K, J. Clavulanic acid biosynthesis and genetic manipulation for its overproduction. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 88, p. 659–669, 2010.

SOUSA-JUNIOR M. A., FERREIRA E. S., CONCEIÇÃO G. C. Betalactamases de Espectro Ampliado (ESBL): um Importante Mecanismo de Resistência Bacteriana e sua Detecção no Laboratório Clínico. **NewsLab**, v. 63, p. 152-174, 2004.

TANG, Z. Improved oxytetracycline production in *Streptomyces rimosus* M4018 by metabolic engineering of the G6PDH gene in the pentose phosphate pathway. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 49, p. 17-24. 2011.

TEODORO, J. C. Influence of feeding conditions on clavulanic acid production in fed-batch cultivation with medium containing glycerol. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 72, p. 450-455, 2006.

TORTORA, G. J. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: ArtMed, 2012.

TRINDADE I. P., DIOGO M. M., PRAZERES D. M., MARCOS J. C. Purification of plasmid DNA vectors by aqueous two-phase extraction and hydrophobic interaction chromatography. **J Chromatogr A.**, v. 5; n. 1082(2), p. 176-84, 2005.

TSUDA M, YAMAKAWA M, OKA S, TANAKA Y, HOSHINO Y, MIKAMI Y, SATO A, FUJIWARA H, OHIZUMI Y, KOBAYASHI J. Brasilibactin A, a cytotoxic compound from actinomycete *Streptomyces brasiliensis*. **J. Nat. Prod.**, v. 68, p. 462–464, 2005.

VENTURA, M.; CANCHAYA, C.; CHANDRA, G.; FITZGERALD, G. F.; CHATER, K. F.; SINDEREN, D. Genomics of Actinobacteria: Tracing the evolutionary History of an Ancient Phylum. **Microbiology And Molecular Biology Reviews**, v. 71, n. 3, p. 495–548, 2007.

VIANA MARQUES D. A., CARNEIRO CUNHA M. N., ARAÚJO J. M., LIMA-FILHO J. L., CONVERTI A., PESSOA-JR A., PORTO A. L. F. Optimization of clavulanic acid production by *Streptomyces* DAUFPE 3060 by response surface methodology. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 658-667, 2011.

VIANA MARQUES D. A., PESSOA-JÚNIOR A., LIMA-FILHO J. L., CONVERTI A., PEREGO P., PORTO A. L. F. Extractive Fermentation of Clavulanic Acid by *Streptomyces* DAUFPE 3060 Using Aqueous Two-Phase System. DOI 10.1002/btpr.526 Published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com), 2010.

VIANA MARQUES, D. A., OLIVEIRA, R. P. S., PEREGO, P., PORTO, A. L. F., CONVERTI, A. Kinetic and thermodynamic investigation on clavulanic acid formation and

degradation during glycerol fermentation by *Streptomyces* DAUFPE 3060, **Enzyme Microb Technol.**, v. 45, p. 169-173, 2009.

VIDEIRA M., AIRES-BARROS M. R. Liquid-liquid extraction of clavulanic acid using an aqueous two-phase system of polyethylene glycol and potassium phosphate. **Journal of Chromatography**, v. 668, p. 237-240, 1994.

VIMAL V., RAJAN B. M., KANNABIRAN K. Antimicrobial activity of marine actinomycete, *Nocardioopsis* sp. VITSVK 5 (FJ973467). **Asian J Med Sci.**, v. 1, n. 2, p. 57-63, 2009.

VON NUSSBAUM F., BRANDS M., HINZEN B., WEIGAND S., HÄBICH D. Antibacterial natural products in medicinal chemistry-exodus or revival? **Angew Chem Int Ed Engl.**, v. 4, n. 45 (31), p. 5072-129, 2006.

WANG, Y. Isolation and purification of a modified phenazine, griseoluteic acid, produced by *Streptomyces griseoluteus* P510. **Research in Microbiology**, v. 162, p. 311-319, 2011.

WILKE M. S., LOVERING A. L., STRYNADKA N. C. J., b-Lactam antibiotic resistance: a current structural perspective. **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, p. 525–533, 2005.

WILLIAMS J. D. b-Lactamases and b-lactamase inhibitors. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 12, n. 1, p. S3–S7, 2009

WORRALL, J. A. R.; VIJGENBOOM, E. Copper mining in *Streptomyces*: enzymes, natural products and development. **Natural Product Reports**, v. 27, p. 742-756, 2010.

YOO, J. C. Production and Biological Activity of Laidlomycin, Anti-MRSA/VRE Antibiotic from *Streptomyces* sp. CS684. **The Journal of Microbiology**, p. 6-10, 2007.

YU, J. Effect of liquid culture requirements on antifungal antibiotic production by *Streptomyces rimosus* MY02. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 2087-2091, 2008.

## **Capítulo II – STABILITY OF CLAVULANIC ACID IN PEG/CITRATE AND LIQUID-LIQUID EXTRACTION IN AQUEOUS TWO-PHASE SYSTEM**

*Este capítulo refere-se a avaliação da estabilidade do ácido clavulânico em soluções de PEG e de citrato e a purificação desta biomolécula em sistemas de duas fases aquosas. Os resultados obtidos no presente trabalho foram aceitos para publicação no periódico *Fluid Phase Equilibria*, com fator de impacto de 2,379.*



## **STABILITY OF CLAVULANIC ACID IN PEG/CITRATE AND LIQUID-LIQUID EXTRACTION IN AQUEOUS TWO-PHASE SYSTEM**

M. N. Carneiro-da-Cunha <sup>a</sup>, K. P. S. Souza <sup>a</sup>, A. M. O. Mota<sup>a</sup>, C. S. Porto <sup>a</sup>, J. A. Teixeira<sup>b</sup>, T. S. Porto <sup>b</sup>, A. L. F. Porto <sup>a\*</sup>

a. Federal Rural University of Pernambuco (UFRPE), Dom Manuel de Medeiros, Dois Irmãos, 52171-900, Recife-PE, Brazil;

b. Institute for Biotechnology and Bioengineering, Centre of Biological Engineering, University of Minho, Campus Gualtar, 4710-057 Braga, Portugal

c. Federal Rural University of Pernambuco (UFRPE), Academic Unit of Garanhuns, Av. Bom Pastor, Boa Vista, 55292-270, Garanhuns-PE, Brazil.

\*Corresponding authors. Tel.: (81) 3320 6345; E-mail addresses: analuporto@yahoo.com.br

## ABSTRACT

$\beta$ -lactamases are enzymes responsible for the hydrolysis of  $\beta$ -lactam antibiotics, being produced by several pathogenic bacteria. Clavulanic acid is a commercially and clinically important  $\beta$ -lactamase inhibitor, its extraction being possible by the application of aqueous two-phase system. In this study, clavulanic acid stability was investigated at different molar mass PEG (400, 1 000 and 20 000 g.mol<sup>-1</sup>) and at different citrate concentrations (5 and 20%) PEG/citrate aqueous-two phase systems (ATPS), under different pH values (4.0 - 8.0). Clavulanic acid extraction was also evaluated. Low citrate concentration and PEG 20000 (g.mol<sup>-1</sup>) ATPS, at pH 6.0, were shown to be the systems that presented the highest clavulanic acid stability. Based on this, a factorial design 2<sup>2</sup> was used to evaluate CA extraction, being PEG (20, 25 and 30%) and citrate (5, 10 and 15%) concentrations the parameters evaluated. Clavulanic acid was extracted into the PEG-rich phase (133.66 mg.L<sup>-1</sup>), the highest values of the partition coefficient and yield being  $K = 5.92$ ,  $Y = 103.53\%$ , respectively. The ATPS was not only effective on clavulanic acid extraction, but also its degradation was minimal. These results clearly indicate that ATPS can be successfully applied as a first step for the purification of clavulanic acid.

**Key words:** Clavulanic acid, ATPS, PEG, citrate salts, stability.

## 1.0 INTRODUCTION

The use of antibiotics to control infectious diseases is greatly hindered by bacterial resistance. One of the most important resistance mechanisms exhibited by a variety of Gram-positive and Gram-negative bacteria is their ability to produce  $\beta$ -lactamases, as  $\beta$ -lactamases hydrolyse the  $\beta$ -lactam ring inactivating penicillins and cephalosporins [1]. The discovery of Clavulanic Acid (CA) and its application as a  $\beta$ -lactamase inhibitor in the presence of antibiotics proved to be an effective approach to face antibiotic resistant bacteria [2].

CA is a mechanism-based inhibitor because it is recognized as a substrate by  $\beta$ -lactamase. CA binds covalently to the enzyme producing chemical modifications (rearrangements) that change the enzyme structure in an irreversible way [3]. CA is a potent antibiotic inhibitor of “serine” (or classes A, C, and D)  $\beta$ -lactamases. It is used in conjunction with amoxicillin in a salt (potassium clavulanate) form and prescribed clinically as co-amoxiclav (Augmentin™ in USA, Clavulin™ in Brazil) or with ticarcillin (Timentin™) [4].

The CA molecule is chemically unstable, due to the susceptibility of the carbonyl group linked to the beta-lactam ring, which can, in the presence of water, suffer an acidic ( $H^+$ )- or alkaline ( $OH^-$ )-catalyzed attack. This property demands, the development of efficient and cost-effective separation and purification processes that allow for the obtention of CA with the required high quality standards of quality for market approval [5].

Among the several techniques available for the purification of CA, aqueous two-phase systems (ATPS) extraction and purification has been studied [5–7]. Aqueous two-phase systems are formed when two hydrophilic components are mixed with water and they are above a threshold concentration [8] These solutes may be two polymers or a polymer and a salt. The ATPS are a convenient and appropriate method for the extraction of biological substances due to the high water content (between 70% and 90%) in both phases. This provides a pleasant environment to work with biologically active compounds because it preserves its molecular stability [9].

The use of CA in the pharmaceutical industry is increasing, consequently studies addressing the effect of pH, temperature, types of salts and their concentrations on CA stability are of particular importance [10]. Several research-groups have conducted studies on the stability of the CA from various sources in aqueous solutions under different conditions.

Generally, CA stability in aqueous solutions is better at pH between 6 and 7 and at temperatures in the range 20 °C to 30 °C [5,7,11,12].

The main aim of this study was the evaluation of the stability of CA in PEG/citrate ATPS at different concentrations and pH values. In addition, the influence of system composition on CA was characterized.

## **2.0 MATERIALS AND METHODS**

### **2.1 Materials**

Potassium salt of CA used for all the solutions and the Imidazole used in CA determination were provided by Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) with 99% purity. Ultra-pure polyethylene glycols (PEG) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). All the other reagents were of analytical grade.

### **2.2 Clavulanic Acid stability in PEG and Citrate salt solutions**

To evaluate CA the effect of PEG molecular weight in CA stability, 25% (w/v) solutions for the several molecular weight PEG considered (400, 10 000 and 20 000 g.mol<sup>-1</sup>) were prepared in McIlvaine buffer at different volumes for pH values at 4.0 - 8.0. CA stability in citrate salts was done by preparing solutions of citrate salts at 5 and 25% (w/v) using different concentrations of sodium citrate and citric acid for pH values ranging from 4.0 to 8.0.

CA stability experiments were done by adding a concentrate CA stock solution (300 mg.L<sup>-1</sup>), reaching an initial CA concentration of 30 mg.L<sup>-1</sup>, to test tubes containing 50 mL of PEG solution or citrate salts solutions. The solutions were then homogenized and aliquots of the solutions were withdrawn during a 24 hours period at time intervals of 15 min in the first hours, and then at three hours intervals. The concentration of non-degraded CA was determined.

According to Bersanetti et al [12], CA degradation in aqueous solutions follows a pseudo-first-order kinetics according to Eq 1, where  $k_2$  is the second order degradation rate constant and  $C$  is CA concentration. After integration, (Eq. 2), the degradation rate constant ( $k_2$ ), can be estimated by linear regression of the experimental data.

$$-dC/dt = k_2C \quad (\text{Eq. 1})$$

$$-\ln C/C_0 = k_2.t \quad (\text{Eq. 2})$$

### 2.3 Clavulanic Acid extraction in aqueous two-phase system (ATPS) PEG/Citrate

A concentrated citrate solution (40% w/w) was prepared by mixing appropriate amounts of sodium citrate ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) and citric acid ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ ) at pH 6.0. The required amount of this solution was mixed with a PEG 20 000  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$  solution in 15 mL graduated tubes with conical tips to achieve the desired composition system. PEG 20 000 concentrations and citrate salt in each system varied according to the factorial design  $2^2$  shown in Table 1. The systems (10 g) were loaded with 2 g of the CA stock solution with initial concentration of  $500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . After mixing for 1 min in a vortex, the mixture was allowed to settle for 60 min at  $20^\circ\text{C}$ , for phase separation. The phase volumes were measured, and each phase was separately withdrawn using pipettes and used for determining the CA concentration in each phase. The response variables were the partition coefficient ( $K$ ) and yield ( $Y$ ) on top and bottom phases. After all experiments, statistical analyzes was conducted using Statistica 8.0 software (Statsoft, Inc., Tulsa-OK, USA)[13].

## 2.4 Clavulanic acid assay

Bird et al. [14] described the spectrophotometric assay by reaction with imidazole, selected in this study. According to this method, the CA concentration is determined by measuring the amount of [1-(8-hydroxy-6-oxo-4-azooct-2-enol)-imidazole] at 312 nm. This product is released by the reaction between CA and imidazole. To determine the CA concentration, a calibration curve from standard stock solutions of potassium clavulanate was used.

## 2.5 Calculation of partition coefficient ( $K$ ), yield ( $Y$ ) and mass balance ( $MB$ )

The CA distribution between phases was expressed in terms of the partition coefficient ( $K$ ), calculated as follows:

$$K = C_T/C_B \quad (\text{Eq. 3})$$

Where  $C_T$  and  $C_B$  are CA concentrations (mg/L) at the top and bottom phases, respectively.

To evaluate the efficiency of extraction of CA, the yield ( $Y$ ) for each phase was calculated according to:

$$Y_x = (C_x \cdot V_x / C_i \cdot V_i) \cdot 100 \quad \text{for } x = T \text{ or } B \quad (\text{Eq. 4})$$

Where:  $C_x \cdot V_x$  is the mass of CA (mg) in the top (T) and bottom (B) phase volume respectively. The  $C_i \cdot V_i$  is the initial mass of CA (mg).

The mass balance ( $MB$ ) for CA is:

$$MB = (C_T \cdot V_T + C_B \cdot V_B) / C_i \cdot V_i \cdot 100 \quad (\text{Eq.5})$$

Where  $C_T.V_T$  and  $C_B.V_B$  is the mass of CA in top phase (T) and bottom phase (B), respectively, and the  $C_i.V_i$  is the initial mass of CA (mg).

### 3.0 RESULTS AND DISCUSSION

In Figure 1 and in Table 2, the experimental results for CA stability in PEG and sodium citrate are presented. The results show, as expected, that the CA degradation in aqueous solution follows a pseudo-first order kinetics (Eq. 1). The CA degradation was similar to other beta-lactam compounds reported in the literature [15]. Straight lines in the figures correspond to the linear adjustments for to each pH value considered. The degradation rate constants ( $k$ ) presented in Table 2 were estimated by linear regression of the experimental results. From Figure 1 and Table 2, it can be concluded that highest degradation rate constant was observed at PEG 20 000 and pH 4 while the lowest occurred at PEG 20 000 and pH 6 after 24h.

#### 3.1.1 Clavulanic acid stability in sodium citrate

Concerning the stability of CA under the studied salt concentrations the results showed an increase of  $k$  with the increase of salt concentration (Table 2). This indicates that at high salt concentrations the CA is more susceptible to degradation.

The results from Table 2 showed that independently of the citrate concentration considered, the degradation in the first hour is residual when compared with the degradation in the following hours (up to 24 hrs). The degradation rate constant, values after the 24 hrs are at least 8 times higher than in the first hour.

The influence of pH was different for the two salt concentrations studied (Table 2). At 5% of citrate, the increase of pH from 4 to 8, led to a decrease in the CA degradation constant

being the maximum and minimum values  $0.0471 \text{ h}^{-1}$  and  $0.0029 \text{ h}^{-1}$ . On the other hand at 20% of citrate, the minimum constant rate obtained was  $0.0074 \text{ h}^{-1}$  at pH 7.0. Bersanetti et al. (2005) evaluated the temperature and pH effect on the CA stability in phosphate buffer. The degradation constant values they reported at  $20^\circ\text{C}$  for pH 6.2 and 7 are  $0.0038 \text{ h}^{-1}$  and  $0.0067 \text{ h}^{-1}$  respectively, which are in the range of values presented in this work. The lower values here reported for CA degradation at pH 7.0 ( $0.0030 \text{ h}^{-1}$ ) may be related with the type of salt used.

After 24h the CA concentration decreased more than 90% at lower pH values (4.0 and 5.0) for the highest citrate concentration tested, while at 5% of citrate the CA degradation was between 30 and 60%. At pH above 6 and after 24 h the CA final concentration was always above 85% and 75% respectively for 5% and 20% of citrate.

Santos et al. [7] reported that at pH 6.0 the CA concentration decreased with the increase of ionic strength. They obtained a 10% decrease in CA at 3M ionic strength after 3 hours. In our case the CA concentration decrease at pH 6 after 3 h was negligible for all citrate concentrations tested.

### 3.1.2 Clavulanic acid stability in PEG

The results for CA stability in McIlvaine buffer (pH 4.0 at 8.0) with different molar mass of PEG (400, 10 000 and 20 000  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) at 25% concentrations, showed low values of CA degradation.

In the first hour, the highest degradation of CA occurred in PEG with molar mass 20 000  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$  at pH 4.0 and 5.0, being the constants rates  $1.30$  and  $0.83 \text{ h}^{-1}$  respectively. From Table 2, it is also possible to observe that for PEGs 10 000 and 20 000 at pH 4.0 the highest degradation values occurred in the first hour. The strong influence of pH on the CA degradation



can be explained due to the nature of the carbonyl group which can be attacked by protons and hydroxide ions [15].

After 24h, results presented in Figure 1 and Table 2 indicate that in the presence of PEG 10 000 g.mol<sup>-1</sup>, CA degradation remains small (Figure 1D), with degradation rate constants varying between 0.05 h<sup>-1</sup> at 0.03 h<sup>-1</sup> for pH 4.0 at 8.0, respectively. However, the lowest CA degradation was observed using PEG with a molar mass of 20 000 g.mol<sup>-1</sup> at pH 6 with a constant rate close to zero (Table 2). Pereira et al., [5] studied the stability of CA at pH 6.5 in PEG with different molar mass (2 000, 4 000 and 6 000 g.mol<sup>-1</sup>) at different concentrations (5 and 15 wt%) during 3 h under 25 °C. These authors observed that the addition of different types and concentrations of PEG did not affect CA stability. They reported that, since PEG is relatively inert, these results were expected. The results obtained in this study indicate that at pH 6.0, CA was more stable for all PEGs molar mass tested, which is in accordance with Pereira et al. [5].

Our results suggest that the best condition for stabilization of CA molecule occurs at higher PEG molar mass (20 000 g.mol<sup>-1</sup>) and pH 6.0.

The main aim of this work was to study the partition of CA in a PEG/citrate ATPS at minimum CA degradation conditions. Previous works reported the migration of CA to the PEG rich phase [6,16,17]. Consequently, the minimum CA degradation conditions are defined according to the minimum CA degradation conditions in the PEG rich phase.

Therefore the conditions used in the ATPS experiments are pH 6 and PEG 20 000 g/mol<sup>-1</sup> as these are the conditions where the CA degradation is lower and good partition coefficients may be obtained. On the other hand, at the selected conditions the CA degradation in the salt-

phase should be negligible or near zero considering the salt concentrations used in the partition experiments.

### 3.2 Clavulanic acid partition in Aqueous Two Phase Systems PEG/citrate

After establishing the best conditions for the stabilization of CA, its partition was characterized in ATPS. The influence of sodium citrate concentrations (5, 10 and 15%) and PEG 20 000 g.mol<sup>-1</sup> concentrations (20, 25 and 30%) at pH 6.0 was evaluated, using a 2<sup>2</sup> factorial design. The obtained results are presented in Table 3.

The first run was the only one that did not form two phases probably because the concentration of the components of the system was below the system's critical point.

The partition coefficients obtained had values above 1.0 ( $1.26 < K_{CA} < 5.92$ ), indicating that the CA molecule has a greater affinity for the polymer phase. Some authors testing ATPS also observed CA migration for the PEG-rich phase, even with other salts than citrate [5,16,18].

Similar values of the partition coefficients ( $K = 2.3-2.7$ ) were reported by Videira and Aires-Barros [16] when studying the CA partition in ATPS with PEG molar mass ranging from 400 – 6 000 (g.mol<sup>-1</sup>) at pH 7 and 8. These authors also stated, as observed in our experiments, that there was no excluded volume effect on CA partition. The excluded volume effect occurs when there is no available volume in the PEG-rich phase due to the high molar mass and concentration of polymer that promotes the exclusion of the target molecule to the bottom phase decreasing the coefficient partition value [19]. The PEG used in this study has a high molar mass (20 000 g.mol<sup>-1</sup>), however, this phenomenon was not observed because of the small size

of CA molecule. In addition, hydrophobic structures on CA molecule allow its interaction with the more hydrophobic PEG-rich phase [16].

Figure 2 and 3 shows that the independent variables (1) PEG Concentration ( $C_{\text{PEG}}$ ) and (2) citrate concentration ( $C_{\text{CIT}}$ ), were significant at 95% confidence for both response variables: the partition coefficient and the CA yield. The independent variable that most positively influenced the CA partition was the  $C_{\text{CIT}}$  while the variable that most influenced the CA yield was  $C_{\text{PEG}}$ .

Our results suggest that higher  $K$  values are obtained at higher sodium citrate and PEG concentrations. The conditions that favor CA partition for the top phase are 30% (w/w) PEG concentration and 15% (w/w) concentration citrate. High PEG concentrations associated with high citrate concentrations favored partitioning for top phase and the partition coefficient increased (Table 2), which was also observed by Pereira et al. [5]. The increase of  $K$  is related with the interactions between the CA properties, the high ionic strength of salt solution and the hydrophobic nature of PEG.

The highest value for CA yield (103.53%), according to Figure 4, was obtained in run 4 with  $C_{\text{PEG}}$  30% (w/w) and 15% (w/w) citrate. The increase of the polymer and salt concentrations favored the accumulation of the target molecule in the PEG phase.

For these conditions, the volume of the top phase was much higher than the volume of the salt-rich phase. Having all these factor in mind and the high CA stability at this PEG molar mass and pH (see section 3.2), its clear that is possible to obtained a good CA separation using PEG/citrate ATPS [5].

Furthermore, Silva et al. [18] reported that ATPS (PEG/phosphate) at low temperatures tends to increase the yield of CA in the PEG phase. These authors used a temperature of 20°C

and obtained about 100% yield, corroborating the temperature and the yield obtained in this work.

The best results reported by Hirata [17] for extraction of CA in an ATPS were obtained for a PEG (400 g.mol<sup>-1</sup>) concentration of 21% (w/w) and a phosphate concentration of 23.6% at pH 7.0. Hirata reached 94% of CA yield and obtained the best PEG phase yield at their higher PEG and salt concentrations. Similar results were also obtained for other molecules such as rentamicin, where it is reported that an extraction yield of 91.3% was obtained for PEG/phosphate ATPS [21].

In the present work, the best yield obtained is higher than the ones reported in the literature for ATPS using PEG/salt [16,18] and is similar to the results reported for aqueous two-phase polymer/polymer systems [5]. Comparing with the literature polymer/salt and polymer/polymer ATPS, a main advantage of the system presented in this work is the lower toxicity of the components used, especially the salt phase.

The partition and yield of CA into the PEG-rich phase can be due to the electrostatic repulsion effect of the sodium citrate. Sodium citrate in aqueous acid pH is decoupled, and negatively charged citric acid (anionic) and positively charged sodium ions (cationic) are formed. In acid conditions, the bottom phase system is rich in citric acid, therefore CA is repelled from this phase because it has the same electric charge. Thus, CA migrates to the PEG-phase where, due to the PEG neutral charge, the repulsion is lower. In association with this phenomenon, the high molar mass PEG has a lower hydrophobicity that attracts less hydrophobic compounds. As CA is neither hydrophilic or hydrophobic [12], it is repulsed from salt-phase due to its high ionic strength. It is reported that in PEG/salt ATPS if the PEG molar mass is increased the partition coefficient and the yield decreases [16,18].

In our experiments, we observed a 5.92 partition coefficient and approximately 100% yield (Table 3), which is in the range of other works. Some works with PEG/phosphate reported a partition coefficient higher than 5.0, but the PEG molar mass used was smaller [5, 18]. Our work suggested that PEG/citrate system is good for CA pre-purification, but it is still necessary to study the influence of PEG molar mass in order to evaluate if the partition coefficient can be improved without decreasing significantly the yield.

It is then possible to say that the CA migration to the PEG phase is related with the interaction of (1) the electrostatic repulsion effect of citrate, (2) the hydrophobic attraction character of PEG and (3) the neutral hydrophilic/hydrophobic properties of CA.

The analysis of the mass balances presented in Table 2, indicates that only in the runs 2 and 3 a degradation of CA was observed, showing that the CA partition in ATPS using PEG/citrate was effective. The mass balance values greater than 100% were considered within the margin of experimental error.

The results showed that a PEG/citrate ATPS with 30% (w/w) of PEG (20 000 g/mol<sup>-1</sup>) and 15 % (w/w) of citrate at pH 6.0 is ideal for CA pre-purification. This system not only provides a high yield, but also low degradation rates are obtained. Moreover, citrate is a non-toxic salt with minimal environmental impact, which reinforces the usefulness of this ATPS, in the pre-purification of CA.

#### 4.0 CONCLUSIONS

Low citrate concentration and PEG 20000 (g.mol<sup>-1</sup>) ATPS, at pH 6.0, were shown to be the systems that presented the highest clavulanic acid stability. It was demonstrated that CA degradation follows a pseudo-first order kinetics.

The best results for CA concentration in the PEG/citrate ATPS were obtained at pH 6.0 in a system containing 30% of PEG and 15% of citrate. Under these conditions, the partition coefficient was 5.92 and the yield was 100% demonstrating the potential application of this non-toxic and environmental friendly ATPS in the pre-purification of CA.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors gratefully acknowledge of CAPES and CNPq (Process nr. 150763/2013-1) for the financial support.

## NOMENCLATURE

ATPS – Aqueous Two Phase System

CA – Clavulanic Acid

PEG – Polyethylene glycol

$k$  - Degradation rate constants ( $\text{h}^{-1}$ )

$K$  - Partition coefficient

$Y$  – Yield (%)

$MB$  – Mass balance (%)

$C_T$  - Clavulanic acid concentrations at the top phase ( $\text{mg.L}^{-1}$ )

$C_B$  - Clavulanic acid concentrations at the bottom phase ( $\text{mg.L}^{-1}$ )

$C_T.V_T$  – Clavulanic acid mass in top phase (mg)

$C_B.V_B$  – Clavulanic acid mass in bottom phase (mg)

$C_i.V_i$  – Initial clavulanic acid mass (mg)

$C_{\text{PEG}}$  – PEG concentration

$C_{\text{CIT}}$  – Citrate concentration

**REFERENCES**

- [1] G.L. Maranesi, A. Baptista-Neto, C.O. Hokka, A. C. Badino. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 21 (2005) 509–514.
- [2] K.H. Baggaley, A.G. Brownb, C.J. Schofield. *Nat. Prod. Rep.* 14 (1997) 309–333.
- [3] F.J. Pérez-Llarena, G. Bou. *Curr. Med. Chem.* 16 (2009) 3740–65.
- [4] D.A Viana, M.N. Carneiro-Cunha, J.M. Araújo, B. Barros-Neto, J.L. Lima-Filho, A. Converti, A. Pessoa-Junior, A.L.F. Porto. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 160 (2010) 1797–807.
- [5] J.F.B. Pereira, V.C. Santos, H.-O. Johansson, J. a. C. Teixeira, A. Pessoa. *Sep. Purif. Technol.* 98 (2012) 441–450.
- [6] C.S. Silva, M.F. Cuel, V.O. Barreto, W.H. Kwong, C.O. Hokka, M. Barboza. *N. Biotechnol.* 29 (2011) 428–31.
- [7] V.C. Santos, J.F.B. Pereira, R.B. Haga, C.O. Rangel-Yagui, J.A.C. Teixeira, A. Converti. *Biochem. Eng. J.* 45 (2009) 89–93.
- [8] M. Perumalsamy, T. Murugesan. *Brazilian J. Chem.* 26 (2009) 171–180.
- [9] J.F. Ferreira, G.D.S. Padilha, E.B. Tambourgi. *Exacta.* 7 (2009) 49–56.
- [10] P.S. Saudagar, S. A. Survase, R.S. Singhal, *Biotechnol. Adv.* 26 (2008) 335–51.
- [11] J. Haginaka, T. Nakagawa, T. Uno, *Chen Pharm Bull.* 29 (1981) 3334–3341.
- [12] P.A. Bersanetti, R.M.R.G. Almeida, M. Barboza, M.L.G.C. Araújo, C.O. Hokka, *Biochem. Eng. J.* 23 (2005) 31–36.
- [13] I. Statsoft, *Statistica*, version 8.0., (2008).
- [14] A.E. Bird, J.M. Bellis, B.C. Gasson. *Analyst.* 107 (1982) 1241–1245.
- [15] J. Konecny, E. Felber, J. Gruner. *J. Antibiot.* 24 (1972) 135–141.
- [16] M. Videira, M. Aires-Barros, *J. Chromatogr.* 668 (1994) 237–240.
- [17] D.B. Hirata, J.H.H.L. Oliveira, K.V. Leão, M.I. Rodrigues, A.G. Ferreira, M. Giulietti, M. Barboza, C.O. Hokka. *Sep. Purif. Technol.* 66 (2009) 598–605.
- [18] C.S. Silva, E. Bovarotti, M.I. Rodrigues, C.O. Hokka, M. Barboza, *Bioprocess Biosyst. Eng.* 32 (2009) 625–32.

- [19] A. Pessoa-Júnior, B.V. Kilikian, Manole - SP. 1st ed., 2005.
- [20] E. Esmanhoto, B.V. Kilikian, J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. 807 (2004) 139–43.



## Tables

Table 1. Levels of independent variables in the  $2^2$  factorial design for CA extraction in **aqueous two-phase system** (ATPS) PEG/Citrate

Variables	Levels		
	-1	0	+1
PEG concentration (%)	20.0	25.0	30.0
Citrate concentration (%)	5.0	10.0	15.0

Table 2. Degradation rate constant of Clavulanic Acid in the first hour (A) and from the first to 24<sup>th</sup> hour (B). (-) not degraded clavulanic acid

(A)	5% Citrate Salts		20% Citrate Salts		PEG 400 (g.mol <sup>-1</sup> )		PEG 10 000 (g.mol <sup>-1</sup> )		PEG 20 000 (g.mol <sup>-1</sup> )	
	<i>K</i>	<i>r</i> <sup>2</sup>	<i>K</i>	<i>r</i> <sup>2</sup>	<i>k</i>	<i>r</i> <sup>2</sup>	<i>K</i>	<i>r</i> <sup>2</sup>	<i>k</i>	<i>r</i> <sup>2</sup>
4	0.0018	0.9643	0.0032	0.8489	0.0027	0.8548	0.3437	0.9917	1.3023	0.9957
5	0.0021	0.9190	0.0100	0.9370	-	-	0.0803	0.7472	0.8367	0.8658
6	-	-	0.0006	0.9157	-	-	-	-	-	-
7	-	-	0.0008	0.9122	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(B)	5% Citrate Salts		20% Citrate Salts		PEG 400 (g.mol <sup>-1</sup> )		PEG 10 000 (g.mol <sup>-1</sup> )		PEG 20 000 (g.mol <sup>-1</sup> )	
	<i>K</i>	<i>r</i> <sup>2</sup>	<i>k</i>	<i>r</i> <sup>2</sup>	<i>k</i>	<i>r</i> <sup>2</sup>	<i>K</i>	<i>r</i> <sup>2</sup>	<i>k</i>	<i>r</i> <sup>2</sup>
4	0.0471	0.9997	0.1561	0.9908	0.0517	0.9933	0.0552	0.9878	0.0495	0.9608
5	0.0166	0.9547	0.0869	0.9940	0.0118	0.9785	0.0084	0.9311	0.0079	0.7014
6	0.0054	0.9810	0.0156	0.9923	-	-	0.0066	0.9942	-	-
7	0.0030	0.9210	0.0074	0.9082	0.0354	0.9888	0.0331	0.9515	0.0384	0.9449
8	0.0029	0.8199	0.0101	0.9988	0.0645	0.9683	0.0301	0.9658	0.0561	0.9571

Table 3. Influence of independent variables PEG concentration and citrate salts concentration on CA concentrations in top and bottom phases, partition coefficient ( $k$ ), yield ( $Y$ ) and mass balance ( $BM$ ) according to the  $2^2$  factorial designs.

Run	CPEG (%)	CSALTS (%)	CA	CA	VOL.	VOL.	(K)	Y	Y	BM
			TOP (mg.L <sup>-1</sup> )	BOTTOM (mg.L <sup>-1</sup> )	TOP (mL)	BOTTOM (mL)		TOP (%)	BOTTOM (%)	
1	20	5	0.00	0.00	0.0	0.0	0.00	0.00	0.00	0.00
2	30	5	83.73	66.49	8.9	0.6	1.26	74.56	3.99	78.55
3	20	15	105.05	67.82	4.9	4.1	1.55	51.48	27.81	79.28
4	30	15	133.66	22.55	5.8	3.2	5.92	103.53	9.63	105.38
5 (C)	25	10	125.00	63.83	6.8	2.7	1.96	85.00	17.23	102.23
6 (C)	25	10	134.31	65.16	6.4	3.1	2.06	85.96	20.20	106.16
7 (C)	25	10	134.31	54.52	6.4	3.0	2.46	85.96	16.36	102.31
8 (C)	25	10	132.98	67.82	6.0	3.0	1.96	79.79	20.35	100.13

## FIGURE CAPTIONS

**Figure 1-** Clavulanic acid degradation in 24 hours (A) citrate solutions with concentration 5% and (B) citrate solutions with concentration 20% ; (C) PEG solutions with molar mass 400 g.mol<sup>-1</sup>, (D) PEG solutions with molar mass 1 000 g.mol<sup>-1</sup>, (E) PEG solutions with molar mass 20 000 g.mol<sup>-1</sup>, in values of pH ranging from 4.0 to 8.0. Where: (○) pH 4.0; (●) pH 5.0; (■) pH 6.0; (□) pH 7.0 and (▲) pH 8.0. Straight lines in the figures are the linear adjustment for each pH.

**Figure 2:** Pareto chart of main effects, and the response variable partition coefficient of clavulanic acid.

**Figure 3:** Pareto chart of main effects, and the response variable clavulanic acid yield in the PEG phase.

**Figure 4:** Graphic representation of clavulanic acid yield in the PEG phase in relation to the concentration of citrate and PEG.

Figure 1

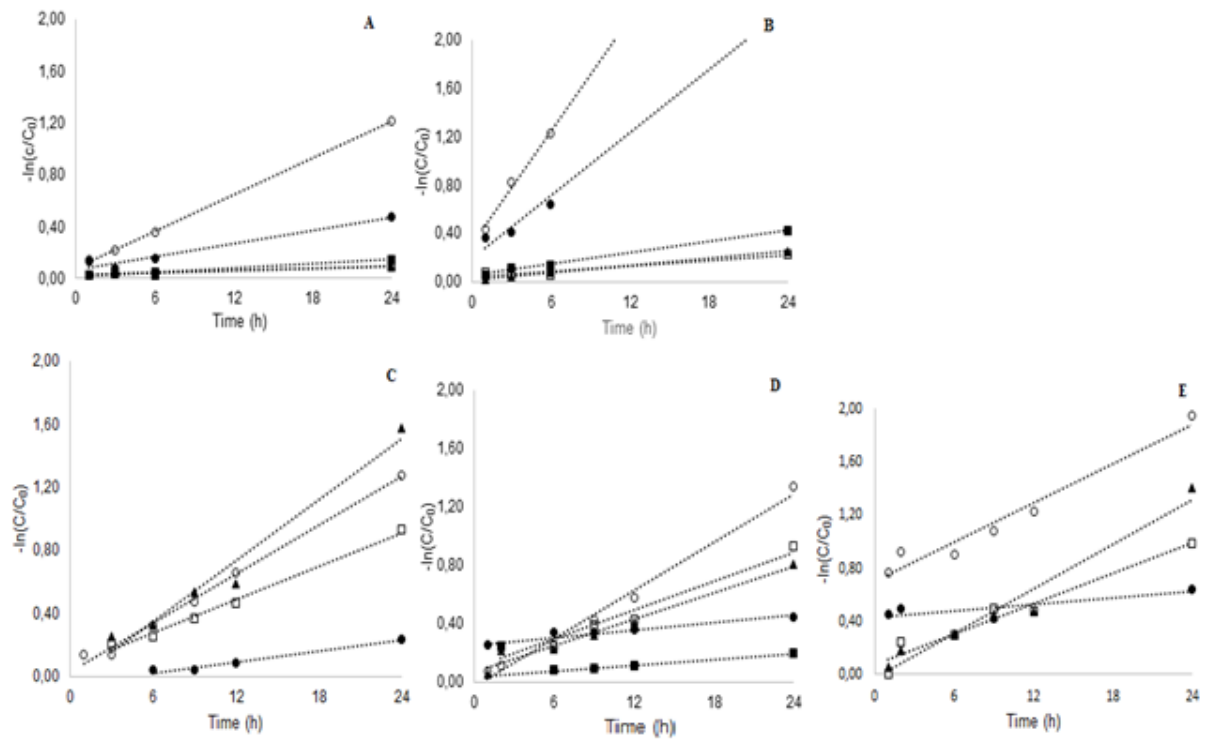


Figure 2

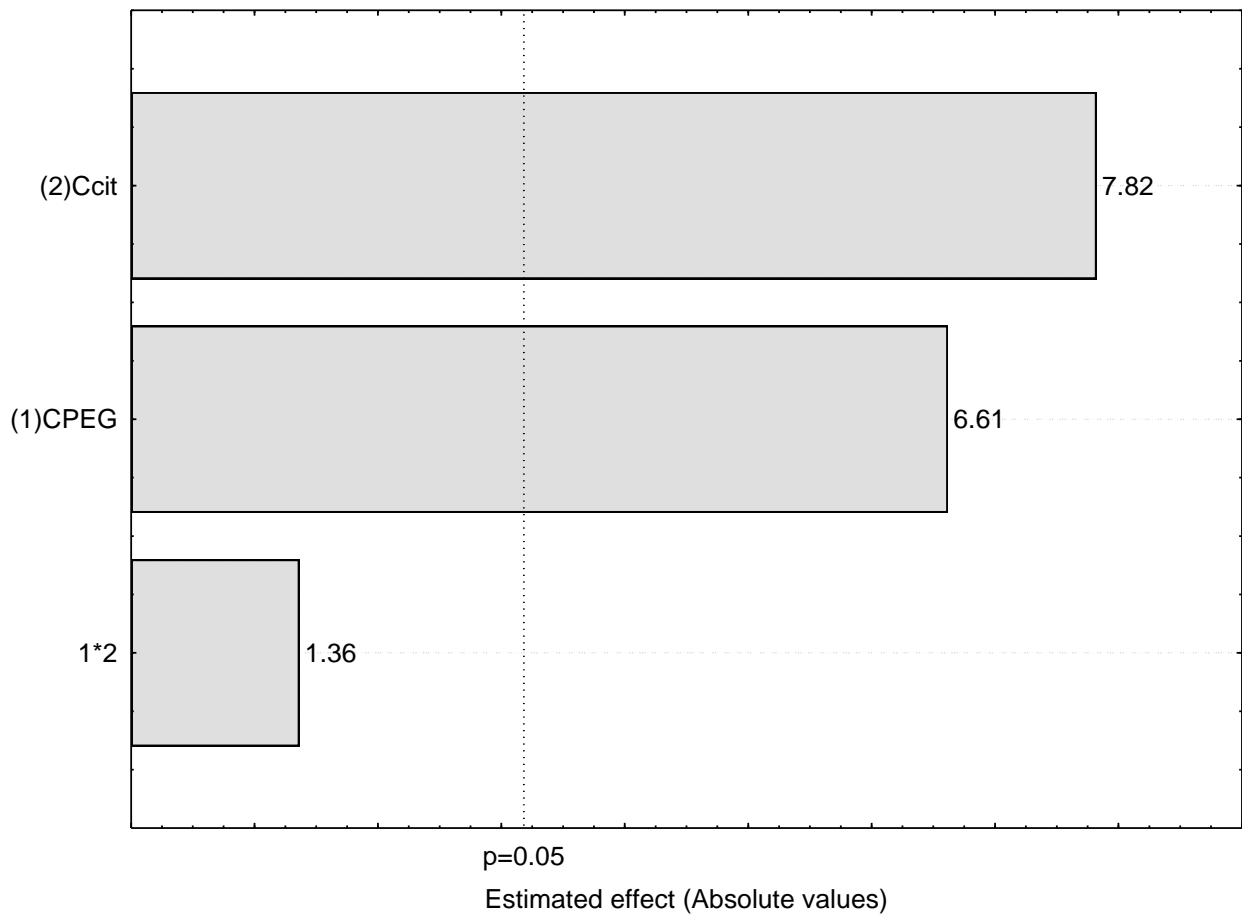


Figure 3

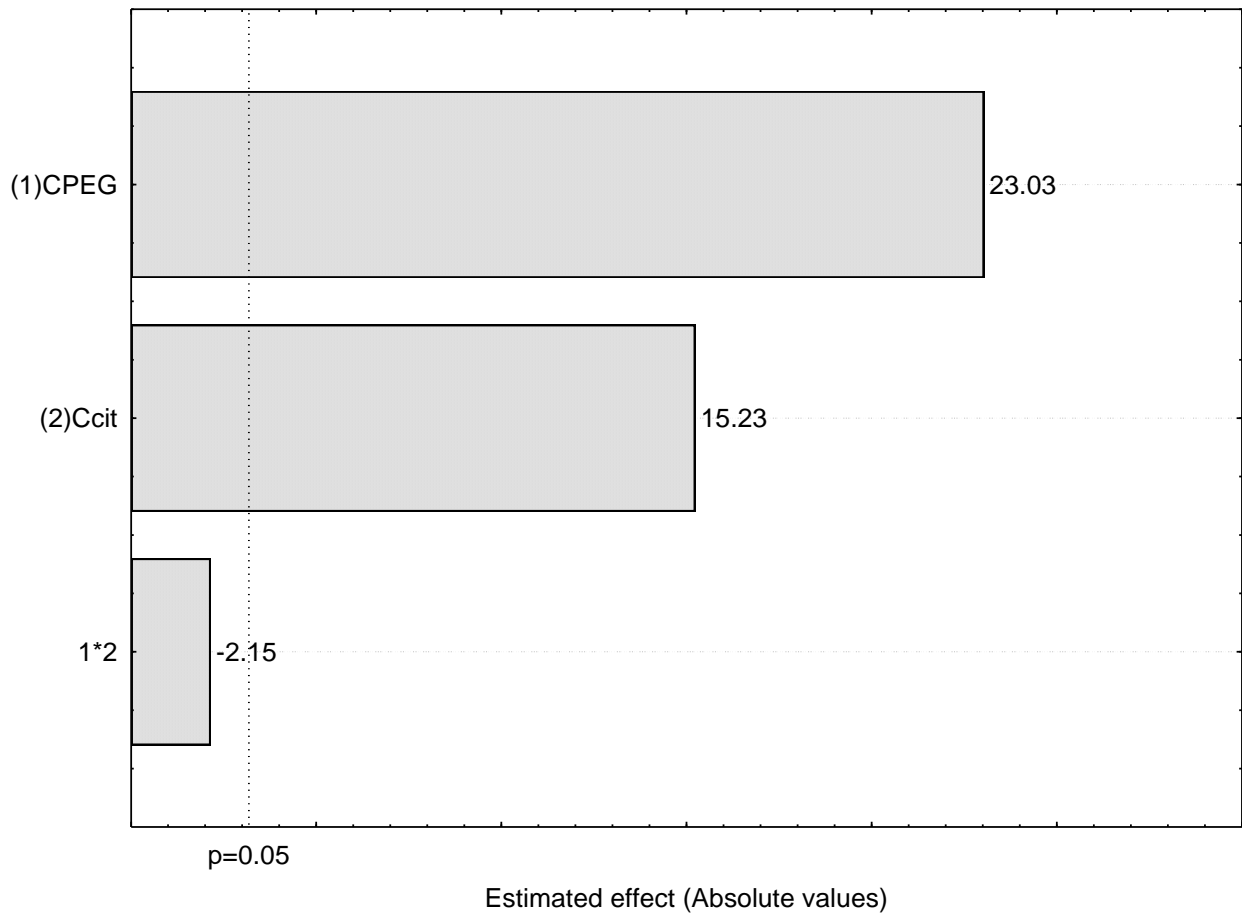
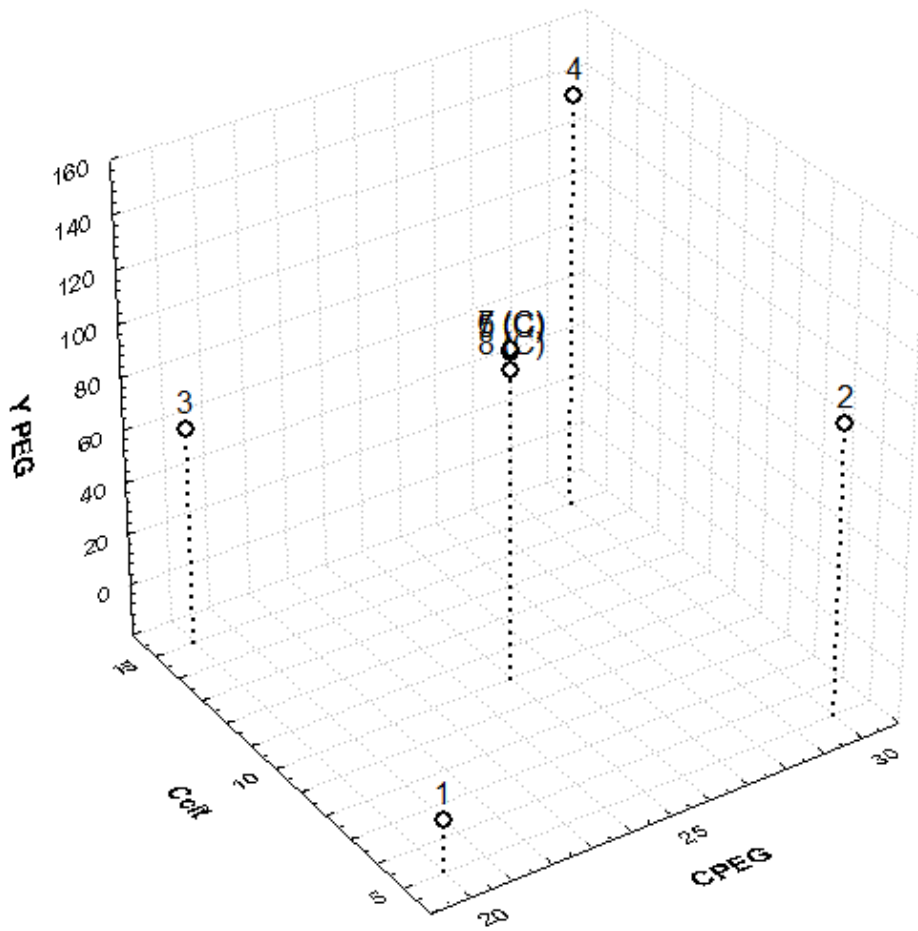


Figure 4





**Capítulo III – INTEGRATED PROCESS PRODUCTION AND  
EXTRACTION OF THE CLAVULANIC ACID FROM  
*Streptomyces malaysiensis* DPUA 1571 USING AQUEOUS TWO-  
PHASE SYSTEM**

*Este capítulo refere-se a produção e extração integrada do ácido clavulânico de Streptomyces malaysiensis DPUA 1571 por fermentação extrativa utilizando sistemas de duas fases aquosas formados por PEG/citrato. Os resultados obtidos no presente trabalho foram enviados para publicação no periódico *Biochemical Engineering Journal*, com fator de impacto de 2,579.*

**INTEGRATED PROCESS PRODUCTION AND EXTRACTION OF THE  
CLAVULANIC ACID FROM *Streptomyces malaysiensis* DPUA 1571 USING AQUEOUS  
TWO-PHASE SYSTEM**

Márcia Nieves Carneiro da Cunha<sup>a</sup>; Camila Souza Porto<sup>a</sup>; Thaís Alves Tinée<sup>a</sup>; Glaucia Manoella de Souza Lima<sup>b</sup>; Tatiana Souza Porto<sup>c</sup>; Ana Lúcia Figueiredo Porto<sup>a</sup>

a. Federal Rural University of Pernambuco (UFRPE), Dom Manuel de Medeiros, Dois

Irmãos, 52171-900, Recife-PE, Brazil;

b. Federal University of Pernambuco (UFPE), Av. Prof Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, 50670-90, Recife-PE, Brazil;

c. Federal Rural University of Pernambuco (UFRPE), Academic Unit of Garanhuns, Av. Bom Pastor, Boa Vista, 55292-270, Garanhuns-PE, Brazil.

\*Corresponding author. Tel.: (81) 3320 6345;

E-mail address: analuporto@yahoo.com.br

## ABSTRACT

Extractive fermentation in aqueous two-phase system (ATPS) is a process that unites the production and purification of the product, which facilitates the simultaneous recovery of biomolecules. Clavulanic acid (CA) is a potent  $\beta$ -lactamase inhibitor clinically used to combat diseases caused by penicillin resistant bacteria. The CA production by *Streptomyces malasyensis* DPUA 1571, as well as, the integrated production and extraction of CA by this microorganism using extractive fermentation in ATPS formed by PEG/citrate was the aim of the present work. A conventional fermentation was performed to verify the ability of *S. malasyensis* DPUA 1571 CA produce. Subsequently, the extractive fermentation was performed in shake flasks for 120 hours and the systems components concentrations varied according to a factorial design  $2^3$ . Were evaluated the influence of PEG molar mass, PEG and citrate concentrations on response clavulanic acid production and the partition coefficient. The highest CA concentration (337.8 mg/L) was obtained in the PEG-rich phase, were used when higher citrate and PEG concentrations (25%). Values of partition coefficient of 1.6 and yields of up to 98.2% were obtained. Therefore, extractive fermentation using ATPS proved effective for the clavulanic acid production and recovery simultaneous.

**Key words:** Clavulanic acid, extractive fermentation, aqueous two-phase system (ATPS), *Streptomyces malasyensis* DPUA 1571.

## 1.0 INTRODUCTION

Clavulanic acid (CA) consists of a  $\beta$ -lactam ring fused to an oxazolidine ring. It has low antibiotic activity but it is a potent and irreversible inhibitor of  $\beta$ -lactamase enzymes produced by bacteria resistant to penicillins and cephalosporins [1].

Clinically, CA is administered in conjunction with other  $\beta$ -lactams. When CA is used in conjunction with sensitive antibiotics to  $\beta$ -lactamase, it protects them against hydrolysis of its

$\beta$ -lactam ring through enzymes, making them effective against bacterial infections producing  $\beta$ -lactamases [2].

Industrially, CA is produced by fermentation of *Streptomyces clavuligerus* and its process of isolation and purification is a complex downstream. Traditionally, the first step of the purification consists of clarification by filtration or centrifugation, followed by adsorption and liquid-liquid extraction with organic solvents and another purification by ion exchange chromatography or other chromatographic techniques [3, 4]. However, it is worth mentioning that CA is a very unstable molecule with high degradation rates, which complicates the process of isolation and purification. Its poor stability in aqueous solutions makes the yield to decrease during purifications steps [1].

Aqueous two-phase system (ATPS) is an alternative method for the CA purification from the fermentation broth. Videira and Aires-Barros [3] studied the liquid-liquid extraction of AC, which is found in the fermented liquid, using ATPS in systems formed by PEG and phosphate salts, the authors observed that under the conditions tested clavulanate potassium showed affinity for the upper phase rich in PEG with high recovery values (90-99%). Silva et al. [5] studied the parameters involved in the CA purification in ATPS PEG - phosphates. Such authors studied the influence of the PEG molar mass (MPEG), pH, temperature, length of the tie-line (TLL) and volume of the phases, and obtained recovery values close to 100%.

The extractive fermentation using aqueous two-phase system (ATPS) provides a technical solution to overcome the limitations of inhibition by the product and low volumetric productivity, which is a characteristic of biotechnological processes. In extractive fermentation, as the name implies, the product removal takes place simultaneously with the synthesis [6].

Viana Marques et al. [7] studied the production and integrated extraction of CA produced by *Streptomyces* sp. DAUFPE 3060 using extractive fermentation composed of PEG/phosphate obtained high yields and productivity. The extractive fermentation minimized

the steps to the CA production. Thus, the development of more efficient separation and purification processes is essential to improve yields and process economics as well as to maintain high quality standards required for marketing approval. In this context, this research aimed at producing CA by *Streptomyces malasyensis* DPUA 1571, as well as produce and simultaneously extract clavulanic acid by this microorganism using extractive fermentation by aqueous two-phase system (ATPS) composed of PEG/citrate. Besides that, we also studied the variables that influence this process.

## 2.0 MATERIAL AND METHODS

### 2.1 Reagents

Potassium clavulanate and imidazole were used to determine the CA concentration in the calibration curve. Sigma Aldrich (São Paulo, Brazil) provided these reagents. Polyethylene glycol (PEG) with different molar mass (1,000; 6,000 and 10,000 g/mol) and citrate salts were from Fluka (Buchs, Switzerland) and Merck (Darmstadt, Germany), respectively.

### 2.2 Microorganism

The microorganism *Streptomyces malasyensis* DPUA1571 was provided by the collection of microorganisms (DPUA) from the Department of Parasitology of the Federal University of Amazonas, Manaus-AM, Brazil. The microorganism was stored in ISP-2 medium (Pridham, 1957) in cryotubes (10% v/v glycerol) at -20°C.

### 2.3 Cultivation Conditions

Reactivation of *S.malasyensis* DPUA1571 was obtained by addition of the stock culture (contained in a cryotube with glycerol) to 50mL of ISP-2 medium in 250 mL-Erlenmeyer flasks that were incubated in an orbital shaker (ET-421-Tecnal) at 28°C, 200 rpm for 24 h.

Afterward, 500 mL-Erlenmeyer flasks containing 150 mL of inoculum medium described by Maranesi et al. [8] with the following composition: glycerol, 10 g/L; soybean flour, 20g/L; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.2 g/L; MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 0.001 g/L; FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.001 g/L; ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.001 g/L; pH 6.8, were inoculated with 15.0 mL of reactivated culture and incubated in an orbital shaker under the same conditions for 48 hours. For conventional and extractive fermentation, aliquots of 5.0 mL of this culture were transferred to 150 mL-Erlenmeyer flasks containing 45 mL of the medium used for the CA production.

## 2.4 Production of Clavulanic Acid

The production of CA was performed using the production medium described by Maranesi et al. [8] presented in the previous section (2.3). The cultures were incubated under orbital shaker at 250 rpm and 20°C for 144 hours. Erlenmeyer flask was taken every 24 hours and the fermented liquid was centrifuged at  $5,500 \times g$  for 20 minutes at 4°C. The supernatant was used to determine the CA concentration, and the cells were washed with distilled water to determine the cell concentration.

## 2.5 Production and integrated extraction of clavulanic acid

The culture medium for extractive fermentation using ATPS was prepared by mixing PEG and citrate salts (sodium citrate and acid citric) according to the factorial design 2<sup>3</sup> and the culture medium described by Maranesi et al. [8]. After adjusting the pH to 6.0, the system was autoclaved at 121 °C for 20 min.

The fermentations were performed under orbital shaker 250 rpm at 25°C for 120 hours. At the end of the process, the flasks were left to settle for 1 hour for phase separation. The volume of each phase was measured, the top and bottom phases were separated carefully with

a pipette and centrifuged separately at  $5,500 \times g$  for 20 minutes at  $4^{\circ}\text{C}$  and then each phase was used for analytical determination (CA concentrations).

The influence of parameters used for CA production by *S. malasyensis* DPUA 1571 in the fermentation process was performed according to a factorial design  $2^3$  as shown in Table 1. Independent variables were PEG molar mass (MPEG), PEG concentration (CPEG) and citrate concentration (CCIT). The response variables were the partition coefficient (K) and yield (Y) of the top phase. The experimental design consisted of 12 trials with 4 repetitions at the central point, needed to calculate the pure error. The effects were evaluated by analysis of variance (ANOVA) with a significance level of 95%. Statistical analysis of the experimental design was performed using Statistica 8.0 software (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA) [9].

## 2.6 Determination of the clavulanic acid concentration

The spectrophotometric assay by reaction with imidazole, selected in this study, was described in detail by Bird et al. [10]. According to this method, the CA concentration in the fermented broth was determined by measuring the increase in the optical density at 311 nm due to the release of the product [1-(8-hydroxy-6-oxo-4-azooct-2-enol)-imidazole] of the reaction between CA and imidazole. Standard solutions of different concentrations of potassium clavulanate were used to determine the concentration of CA.

## 2.7 Determination of Cell Concentration

Cell concentration was determined through the cell dry mass weight according to the method described by Olsson and Nielsen [11].

## 2.8 Methodology for the analysis of results

AC distribution between phases was expressed in terms of the partition coefficient (K), calculated as follows:

$$K = \frac{C_T}{C_B}$$

Where:  $C_T$  and  $C_B$  are the CA concentrations in mg/L at the top and bottom phases, respectively.

The yield (Y) of clavulanic acid in extractive fermentation was calculated according to Chouyyok et al, [12] by using the following equation:

$$Y (\%) = \frac{100}{1 + (1/Vr) (1/K)}$$

Where: Vr is the volumes ratio of the phases and K is the partition coefficient.

### 3.0 RESULTS AND DISCUSSION

#### 3.1 Production of Clavulanic Acid (CA)

This is the first report of the *S. malaysiensis* DPUA 1571, the new specie, as a CA producer. CA was first isolated from *S. clavuligerus* [13] and later by other species of *Streptomyces*, such as *Streptomyces jumonjinensis* [14], *Streptomyces katsurahamanus* [15], *Streptomyces lipmanii* [16] and *Streptomyces* sp. [17]. In addition, have already been identified several species of *Streptomyces* producing other Clavans metabolites similar structurally to CA, such as clavaminic acid, 2-hydroxyethylclavam, valclavam and clavamycins. It is important to note that species of *Streptomyces* producing CA also produce other  $\beta$ -lactam compounds. However, the species that produce other metabolites Clavans do not seem to possess this capability [18]. The number of *Streptomyces* species described as producing CA do not exceed the number of species that produce only other Clavans compounds. This fact indicates that the capacity of CA biosynthesis through microorganisms has more restricted distribution [19].

The CA production by submerged fermentation was carried out in order to verify the ability of *S. malaysiensis* DPUA 1571 to produce CA. This production was evaluated during



the culture every 24h until the period of 144h. CA highest concentration (387.66 mg/L) was obtained after 72 hours of cultivation fermentation, as can be seen in Figure 1.

Koberkandi et al. [20] verified low CA production for *S. clavuligerus* mutants species through UV irradiation in culture containing soybean meal and glycerol. These authors found a CA concentration of 343.87 mg/L after 72 hours of cultivation of M60 mutant. In this study, it was obtained a higher CA production in the same production time.

Ortiz et al. [21] investigated the influence of different types of soy products as a nitrogen source (soy flour and soy protein isolate) in the CA production by *S. clavuligerus*. The results obtained by these authors showed that the CA production was used when a medium containing soy flour as nitrogen source (700 mg/L) was approximately two times higher than the production obtained when using the soy protein isolate as nitrogen source (340 mg/L).

Viana et al. [17] investigated the influence of five variables, namely pH (6.0, 6.4, and 6.8), temperature (28°C, 30°C, and 32°C), agitation intensity (150, 200, and 250 rpm), glycerol concentration (5.0, 7.5, and 10 g/L) and soybean flour concentration (5.0, 12.5, and 20 g/L), on CA production of *Streptomyces* sp (DAUFPE 3060). These authors found that the highest results of the CA production 494.0 mg/L were obtained at higher temperature (32°C), pH 6.0, lower glycerol concentration (5.0 g/L) and higher concentration of soybean flour (20.0 g/L). CA production obtained by these authors was higher comparing to the production obtained in this study. However, it can be seen that the concentrations of the components of the production medium used as well as different concentrations of cultivation influence the CA production by *Streptomyces* species.

*S. malaysiensis* DPUA 1571 proved to be a potential source for obtaining CA. The next step of this research was to produce and simultaneously extract CA using the technique of extractive fermentation in ATPS.

### 3.2 Extractive Fermentation of Clavulanic Acid

Table 2 shows the matrix of the factorial design and the results for the responses CA concentration, partition coefficient (K) and yield obtained from the extractive fermentation of *Streptomyces malaysiensis* DPUA 1571.

There was not phase formation in run 1 only. The component concentrations of this system were below or very near the critical point of the binodal curve, and systems with concentrations below this point are monophasic [22].

According to Sinha et al. [23] in an ideal extractive fermentation, the cells and the substrate should concentrate preferably under a single phase, while the biomolecule (product) should concentrate on the opposite phase. It facilitates the removal of the product from its production, and minimizes the inhibition effect and provides a prepurification of the molecule. In all the tests, the CA preferentially partitioned into the top phase (PEG-rich) with values of  $K > 1$ , while the cells were partitioned to the interface for providing a clarifying of the cultivation medium.

CA highest concentration obtained in the top phase was 337.84 mg/L in the run 8 comprises MPEG 10.000 and higher concentrations of citrate and PEG 25 and 25% respectively. These results agree with those reported by Viana Marques et al. [7], when these authors studied the extractive fermentation of *Streptomyces* sp. DAUFPE 3060 aiming the CA production and extraction using ATPS composed by PEG having molar mass of 4.000, 8.000 and 10.000 g/mol and 25% of phosphate salts. They observed no affinity of this molecule to the salt-rich phase at the conditions studied, noting values of K greater than one for all trials, with the highest CA concentration (426 mg/L) obtained in the test consisting of PEG molar mass 8.000 g/mol.

The influence of the independent variables can be observed in Figure 2: PEG molar mass - MMPEG (1), PEG concentration - CPEG (2) and citrate concentration - CCIT (3) and their interactions 1x2, 1x3, 2x3 and 1x2x3 in the response partition coefficient (K). The interaction between CCIT and CPEG was significantly and positive for the partition coefficient, indicating that the best values for the partition coefficient (K) were obtained in higher concentrations of citrate and PEG (25 %).

Videira and Aires-Barros [3] used ATPS formed by PEG and phosphate salts for the "*in situ*" extraction of CA from a commercial potassium clavulanate solution. These authors observed that higher potassium clavulanate concentrations were obtained in the top phase (PEG-rich) with the increase of phosphate concentration in the lower phase. This behavior was likely a result of the occurrence of the phenomenon known as *salting out*, the CA solubility in the salt-rich phase decreased as result of the increase of ionic strength, and thus, the separation from CA for the top phase occurs.

In this study, the highest value for the partition coefficient was  $K=1.63$ , and it was obtained in run 8 with 25% PEG concentrations and 25% citrate concentration. This partition coefficient was lower in comparison to that results obtained by Viana Marques et al., [7] ( $K = 19.4$ ) when studying the production and simultaneous extraction of CA by *Streptomyces* sp DAUFPE 3060 using extractive fermentation with ATPS PEG/phosphate.

Yield values obtained in the extractive fermentation process are shown in Table 2. The highest yield obtained was 98.20% in the run 1 formed by MPEG 1,000 g/mol; 15% of CPEG and 15% of CCIT.

The influence of the independent variables (1) MPEG (2) CPEG and (3) CCIT, as well as their interactions (1x2), (1x3), (2x3) and (1x2x3) are shown in Figure 3. It can be observed that the three independent variables had significant effects under the yield as well as the

interactions 1x2 and 2x3. CPEG and MPEG were the variables that presented greater effect under this response variable. CPEG presented significant and positive effect, indicating that there a higher yield in higher concentrations of this polymer. While MPEG presented significant and negative effect, i.e., the highest yields were obtained in tests consisting of PEG of lower molar mass.

Silva et al. [5] evaluated the parameters effects involved in the CA purification found in fermented broth of *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064 by ATPS. These authors used systems formed by PEG (600, 1000 and 4000 g/mol) and phosphate salts at different pH values (6.5, 7.0 and 7.5) and temperatures (20.0, 25.0 and 30.0°C). Values of the partition coefficient (K) up to 18.1, with yields of 88.0% were obtained. The authors found that the increase in MPEG 600-4000 resulted in a decrease in partition and yield coefficient. In addition, there was a decrease in performance when used for higher temperatures, since this variable was related to the rate of CA degradation that is greater at high temperature.

Viana Marques et al. [7] observed the CA production by *Streptomyces* sp. DAUFPE 3060 using extractive fermentation by ATPS PEG/phosphate salts. The experiments were performed in flasks and in a bioreactor. In studies carried out in flasks these authors obtained yield values ranging from 60 to 90% for the top phase that had higher yields. Higher yields were obtained when PEG was used with molar mass 8,000 g/mol and higher concentrations of PEG and phosphate (25.0%).

However, in extractive fermentation using ATPS formed by PEG and citrate when in comparison with conventional fermentation, presents the key advantages of such a system include the ease of scale-up, high selectivity and the stabilization of the biomolecular structure by the polymers comprising the system. As well as, the integration of the production and

extraction process in one-step reducing significantly the number and cost of production processes.

Furthermore, it was observed that CA production was greater in the extractive fermentation (337.84 mg/L PEG-rich phase and 207.21 mg/L citrate-rich phase) when compared with conventional fermentation (387.66 mg/L). This fact indicates that during extractive fermentation occurred a higher stabilization of CA molecule, and this is a viable technique for production and extraction of  $\beta$ -lactamase inhibitor.

#### 4.0 CONCLUSION

*Streptomyces malasyensis* DPUA 1571 proved to be a potential source for obtaining CA, and this is the first report of this specie as a CA producer. The extractive fermentation demonstrated to be a viable method of CA production when compared with conventional fermentation. Since the best results of CA production from *Streptomyces malasyensis* DPUA 1571 were obtained when using extractive fermentation. Thus, *Streptomyces malasyensis* DPUA 1571 proved to be a viable source for the production of clavulanic acid with potential for future use in industrial processes. Therefore, extractive fermentation using aqueous two-phase system formed by PEG and citrate presents itself as a promising method for simultaneous production and extraction of clavulanic acid.

#### ACKNOWLEDGMENTS

The authors gratefully acknowledge of CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) and CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) (Process nr. 555146/2010-3) for the financial support.

**REFERENCES**

- [1] J. H. H. L. Oliveira, A. C. Granato, D. B. Hirata, C. O. Hokka, M. Barboza. Ácido clavulânico e cefamicina c: uma perspectiva da biossíntese, processos de isolamento e mecanismo de ação. 32 (2009) 2142–2150.
- [2] P.A. Bersanetti, R. M. R. G. Almeida, M. Barboza, M. L. G. C. Araújo, C. O. Hokka, Kinetic studies on clavulanic acid degradation. *Biochemical Engineering Journal*, 1 (2005) 31–36.
- [3] M. Videira, M. Aires-Barros. Liquid-liquid extraction of clavulanic acid using an aqueous two-phase system of polyethylene glycol and potassium phosphate. *Journal of Chromatography A*, 668 (1994) 237–240.
- [4] J. F. B. Pereira, V. C. Santos, H. O. Johansson, J. A.C. Teixeira, A. Pessoa-Junior. A stable liquid–liquid extraction system for clavulanic acid using polymer-based aqueous two-phase systems. *Separation and Purification Technology*. 98 (2012) 441–450.
- [5] C. S. Silva, E. Bovarotti, M. I. Rodrigues, C. O. Hokka, M. Barboza. Evaluation of the effects of the parameters involved in the purification of clavulanic acid from fermentation broth by aqueous two-phase systems. *Bioprocess and biosystems engineering*, 32 (2009) 625–32.
- [6] R. M. Banik, A. Santhiagu, B. Kanari, C. Sabarinath, S.N. Upadhyay, Technological aspects of extractive fermentation using aqueous two-phase systems. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 19 (2003) 337–348.
- [7] D. A. Viana Marques, A. Pessoa-Júnior, J. L. Lima-Filho, A. Converti, P. Perego, A. L. F. Porto. Extractive fermentation of clavulanic acid by *Streptomyces* DAUFPE 3060 using aqueous two-phase system. *Biotechnology progress*, 27 (2010) 95–103.

- [8] G. L. Maranesi, A. baptista-neto, C. O. Hokka, A. C. Badino. Utilization of vegetable oil in the production of clavulanic acid by *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21 (2005) 509–514.
- [9] STATSOFT, I. Statistica, version 8.0. ,2008.
- [10] A. E. Bird, J. M. Bellis, B. C. Gasson. Spectrophotometric Assay of Clavulanic Acid by Reation with Imidazole. *Analyst*, 107 (1982) 1241-1245.
- [11] L. Olsson, J. Nielsen, On-line and in situ monitoring of biomass in submerged cultivations. *TIBTECH*, 15 (1997) 517–522.
- [12] W. Chouyyok, N. Wongmongkol, N. Siwarungson, S. Prichanont, Extraction of alkaline protease using an aqueous two-phase system from cell free *Bacillus subtilis* TISTR 25 fermentation broth. *Process Biochemistry*, 40 (2005) 3514–3518.
- [13] A. G. Brown, D. Butterworth, M. Cole, G. Hanscomb, J. D. Hood, C. Reading, G. N. Rolinson. Naturally-occurring  $\beta$ -lactamase inhibitors with antibacterial activity. *The Jornal of Antibiotics*, 24 (1976) 5–6.
- [14] S. J. Box. Clavulanic acid and its salts by fermentation. *Chem. Abstr.* 87 (1977) 4031
- [15] K. Kitano, K. Kintaka, K. Katamoto. Clavulanic acid pro- duction by *Streptomyces katsurahamanus*. *Chem. Abstr.* 90 (1979) 119758.
- [16] S. W. Elson, K. H. Baggaley, J. Gillett, S. Holland, N. H. Nicholson, J. T. Sime, S. R. Woroniecki. Isolation of two novel in- tracellular  $\beta$ -lactams and a novel dioxygenase cyclising enzyme from *Streptomyces clavuligerus*. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* (1987) 1736–1738

- [17] D. A. Viana, M. N. Carneiro-Cunha, J. M. Araújo, B. Barros-Neto, J. L. Lima-Filho, A. Converti, A. Pessoa-Júnior, A. L. F. Porto. Screening of variables influencing the clavulanic acid production by *Streptomyces* DAUFPE 3060 strain. *Applied biochemistry and biotechnology*, 160 (2009) 1797–807.
- [19] A. S. Paradkar, S. E. Jensen. Biosynthesis and molecular genetics of clavulanic acid. *Antonie van Leeuwenhoek*, 75 (1999) 125–33.
- [18] J. Y. Song, E. S. Jensen, K. J. Lee. Clavulanic acid biosynthesis and genetic manipulation for its overproduction. *Applied microbiology and biotechnology*, 88, (2010) 659–690.
- [20] H. Korbekandia, P. Darkhalb, Z. Hojatic, D. Abedib, J. Hamedid, M. Pourhoseina, Overproduction of Clavulanic Acid by UV Mutagenesis of *Streptomyces clavuligerus*. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. 9 (2010) 177-181.
- [21] S. C. A. Ortiz, C. O. Hokka, A. C. Badino. Utilization of soybean derivatives on clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus*. *Enzyme and Microbial Technology*, 40 (2007) 1071–1077.
- [22] T.S. Porto, P.A. Pessoa-Filho, B. Barros-Neto, J.L. Lima-Filho, A. Converti, A.L.F. Porto, A. Pessoa-Jr, Removal of protease from *Clostridium perfringens* fermented broth by two-phase systems (PEG-citrate), *J. Microbiol. Biotechnol.* 34 (2007) 547–552
- [23] J. Sinha, P. Dey, T. Panda. Extractive fermentation for improved production of endoglucanase by an intergeneric fusant of *Trichoderma reesei/Saccharomyces cerevisiae* using aqueous two-phase system. *Biochemical engineering journal*, 6 (2000) 163–175.



## TABLES

Table 1. Levels of independent variables in the  $2^3$  factorial design for clavulanic acid production and extraction in extractive fermentation.

Variables	Levels		
	-1	0	+1
(1) PEG Molar Mass – MPEG (g/mol)	1.000	6.000	10.000
(2) PEG concentration - CPEG (w/w%)	15	20	25
(3) Citrate concentration - Ccit (w/w%)	15	20	25

Table 2. Influence of independent variables PEG Molar Mass, PEG concentration and citrate concentration on CA concentrations, partition coefficient (K) and yield (Y) according to the  $2^3$  factorial designs, after 120 hours of cultivation in extractive fermentation.

Runs	MPEG (g/mol)	CPEG (w/w%)	Ccit (w/w%)	AC top (mg/L)	AC bottom (mg/L)	K	Y (%)
1	1.000	15	15	315.32	225.23	1.40	98.20
2	10.000	15	15	288.29	216.22	1.33	65.57
3	1.000	25	15	315.32	243.24	1.30	98.06
4	10.000	25	15	252.25	229.73	1.10	76.71
5	1.000	15	25	310.81	238.74	1.30	72.25
6	10.000	15	25	279.28	238.74	1.17	28.41
7	1.000	25	25	333.33	220.72	1.51	96.40
8	10.000	25	25	337.84	207.21	1.63	65.08
9 (C)	6.000	20	20	247.75	229.73	1.08	59.17
10 (C)	6.000	20	20	274.77	211.71	1.30	61.01
11 (C)	6.000	20	20	279.28	243.24	1.15	53.45
12 (C)	6.000	20	20	265.77	216.22	1.23	55.14

## FIGURE CAPTIONS

Figure 1. Clavulanic acid production from *Streptomyces malasyensis* DPUA 1571.

Figure 2. Pareto chart of the main effects of the independent variables: PEG molar mass (MPEG), PEG concentration (CPEG) and citrate concentration (CCIT), to the partition coefficient (K).

Figure 3. Pareto chart of the main effects of the independent variables: molar mass of PEG (MPEG), PEG concentration (CPEG) and citrate concentration (CCIT) to the yield (Y).

Figure 1.

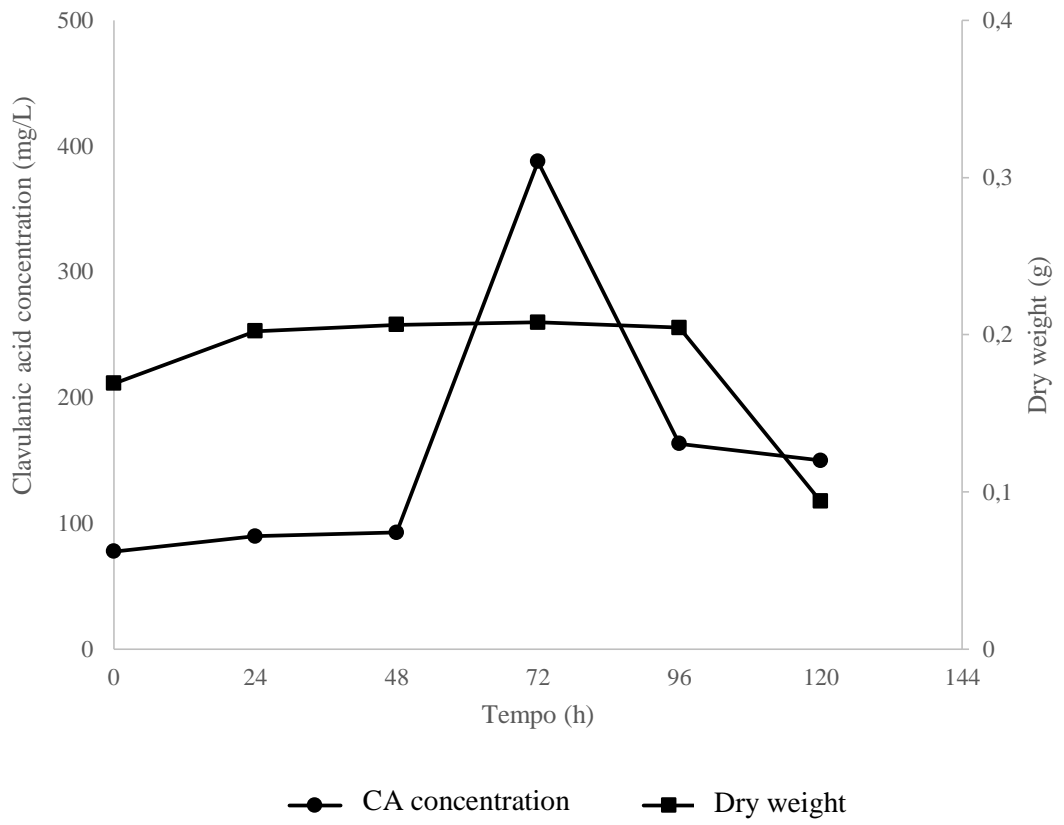


Figure 2.

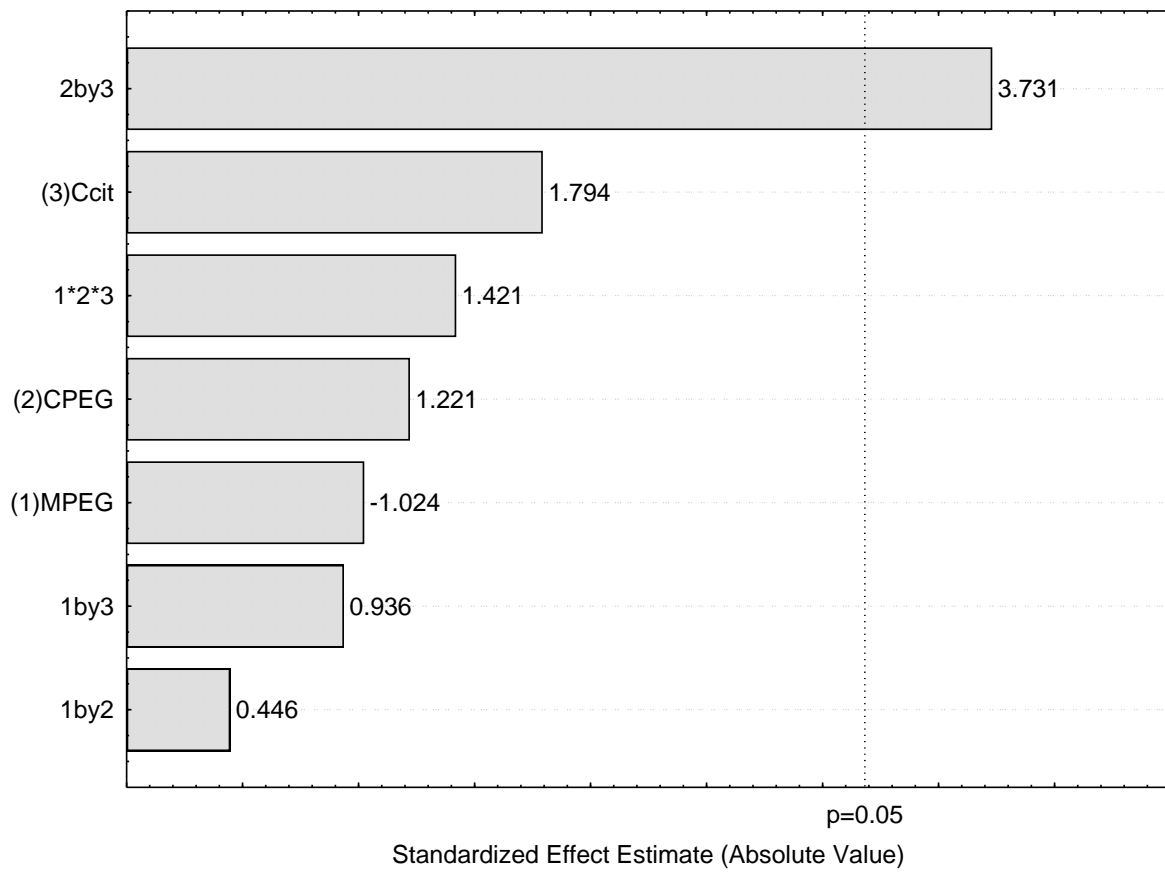
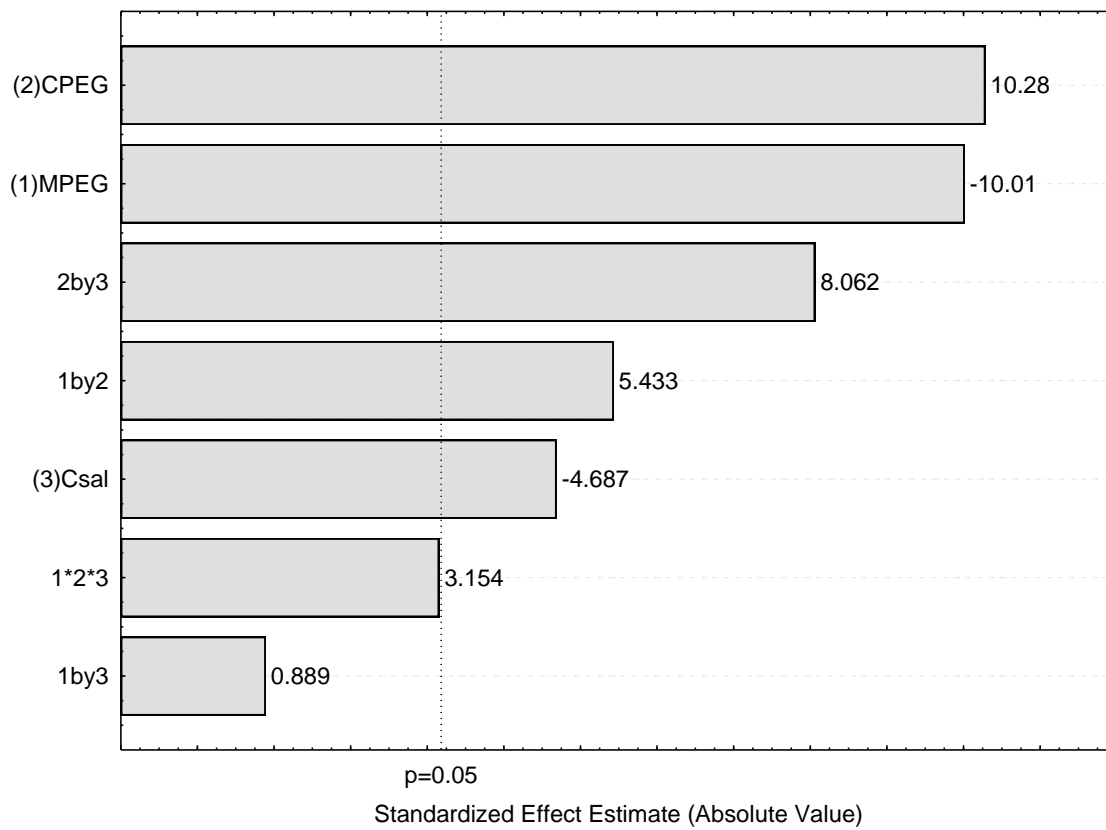


Figure 3.



## **Capítulo IV – PRODUÇÃO DE ÁCIDO CLAVULÂNICO POR *Streptomyces malasyensis* DPUA 1571 EM BIORREATOR**

*Este capítulo refere-se a produção do ácido clavulânico por Streptomyces malaysiensis DPUA 1571 em biorreator.*

## **PRODUÇÃO DE ÁCIDO CLAVULÂNICO POR *Streptomyces malasyensis* DPUA 1571 EM BIORREATOR**

*Márcia Nieves Carneiro da Cunha<sup>1</sup>, Késsia Porfírio da Silva<sup>1</sup>, Camila Souza Porto<sup>1</sup>, Maria Francisca Simas Teixeira<sup>2</sup>, Tatiana Souza Porto<sup>3</sup>, Ana Lucia Figueiredo Porto<sup>1</sup>*

1. Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Dom Manuel de Medeiros, Dois Irmãos, 52171-900, Recife-PE, Brasil;
2. Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Av. General Rodrigo Octávio Jordão Ramos, 3000, Campus Universitário, Coroado I, 69077-000, Manaus-AM, Brasil.
3. Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Unidade Acadêmica de Garanhuns, Av. Bom Pastor, Boa Vista, 55292-270, Garanhuns-PE, Brasil.



## RESUMO

O ácido clavulânico (AC) é um antibiótico  $\beta$ -lactâmico, que possui potente atividade inibitória das enzimas  $\beta$ -lactamases produzidas por bactérias resistentes às penicilinas. Este trabalho teve como objetivo verificar a influência de diferentes variáveis sob a produção de AC por *Streptomyces malasyensis* DPUA 1571 em biorreator. A influência das variáveis: concentrações da fonte de carbono (glicerol 5, 10 e 15 g/L), agitação (200, 500 e 800 rpm) e temperatura (15, 20 e 25 °C) foram investigadas sob a variável resposta produção do ácido clavulânico por *Streptomyces malasyensis* DPUA 1571 em biorreator de bancada (L) tipo tanque agitado utilizando um planejamento fatorial  $2^3$ . A aeração e o pH foram fixados em 0,5vvm e pH 6,0, respectivamente. Após 120 horas de cultivo a maior produção de AC foi observada no ensaio com maior concentração de glicerol, maior agitação e menor temperatura, sendo esta produção de 2241,38 mg/L. Os resultados permitem concluir que *Streptomyces malasyensis* DPUA 1571 é uma promissora fonte de ácido clavulânico com potencial para aplicação na área farmacêutica.

**Palavras chave:** ácido clavulânico, *Streptomyces malasyensis*, biorreator.

## 1.0 INTRODUÇÃO

O principal mecanismo de resistência bacteriana aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos é através da produção de enzimas que apresentam grupos nucleofílicos (em geral, resíduos de serina) capazes de promover a abertura do anel  $\beta$ -lactâmico, levando desta forma a inativação deste agente quimioterápico (Guimarães et al., 2010). As enzimas  $\beta$ -lactamases são produzidas por uma grande variedade de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. Essas enzimas são codificadas em cromossomos ou sítios extracromossômicos através de plasmídeos ou transposons, podendo ser produzidas de modo constitutivo ou ser induzido. A resistência quase

universal de *Staphylococcus aureus* à penicilina é mediada por uma  $\beta$ -lactamase induzível, codificada por plasmídeo (Anvisa, 2013).

Estratégias destinadas a superar o problema da resistência adquirida por bactérias são de crescente interesse principalmente pelas industriais farmaco-químicas. Dentre as estratégias que vêm sendo utilizadas clinicamente para contornar o problema da resistência bacteriana está o desenvolvimento de compostos que atuam como inibidores de  $\beta$ -lactamase. Os inibidores de  $\beta$ -lactamase são prescritos em combinação com os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos convencionais (Saudagar et al., 2008).

O ácido clavulânico (AC) possui atividade antibacteriana relativamente fraca, mas tem-se mostrado um potente inibidor das  $\beta$ -lactamases produzidas por bactérias patogênicas Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* (MSSA), *S. epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pyogenes*, *S. pneumoniae*, entre outras) e também contra muitas bactérias Gram-negativas, tais como: *Haemophilus influenzae*, *H. parainfluenzae*, *M. catarrhalis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *P. vulgaris* (Oliveira et al., 2009; Brown et al., 1976).

AC é utilizado clinicamente como sal de potássio em conjunto com amoxicilina, e comercializado em combinação com a amoxicilina (Augmentin™) ou com ticarcilina (Timentin™) (Baggaley et al., 1997).

Tradicionalmente o AC é produzido em biorreator de tanque agitado convencional por *Streptomyces clavuligerus* em meios de cultura contendo glicerol e derivados de soja, como fontes de carbono e nitrogênio, respectivamente (Cerri et al., 2012).

Ortiz et al. (2007) investigaram a influência do tipo de derivados de soja como fonte de nitrogênio e a influência simultânea das concentrações de fontes de nitrogênio e de carbono na produção de AC por *S. clavuligerus*.

Baptista-Neto et al. (2005) compararam dois métodos para a produção de AC por *S. clavuligerus* em biorreator: cultivo contínuo e cultivo em batelada. A maior produção de AC foi obtida no cultivo em batelada; no entanto, a maior produtividade foi obtida no cultivo contínuo.

Neste contexto, este trabalho teve como objetivo o estudo de variáveis que influenciam a produção de AC em biorreator de bancada tipo tanque agitado por *Streptomyces malasyensis* DPUA 1571, como uma nova fonte de obtenção de AC.

## **2.0 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Reagentes**

A curva de calibração utilizada para a determinação quantitativa do ácido clavulânico presente nas amostras foi realizada utilizando clavulanato de potássio produzido por *Streptomyces clavuligerus* comercializado pela Sigma Aldrich (São Paulo, São Paulo, Brasil). Os demais reagentes utilizados no presente trabalho foram de grau analítico.

### **2.2 Manutenção e reativação do micro-organismo**

*Streptomyces malasyensis* DPUA 1571 foi isolado de líquens da Região Amazônica e pertence a Coleção de Micro-organismos do Departamento de Parasitologia da Universidade Federal do Amazonas, Manaus-AM, Brasil. O micro-organismo foi estocado em criotubos de 2,0 mL contendo glicerol (10 %, v/v) a -20 °C

Para a reativação da espécie, o conteúdo de um criotubo foi transferido para Erlenmeyers contendo 50 mL do meio ISP-2 (Pridham et al., 1957). Os frascos foram incubados em agitador orbital (TE-421-Tecnal) a 28 °C, 200 rpm, por 48 h.

### 2.3 Produção de ácido clavulânico

Após o período de reativação alíquotas correspondendo a 10% do volume final foram transferidas para Erlenmeyers de 250 mL contendo 90 mL do meio utilizado para o pré-inóculo para um volume final de 100 mL. O meio de pré-inóculo foi descrito por Maranesi et al. (2005) e possui a seguinte composição: 10 g/L de glicerol; 20 g/L da farinha de soja; 1,2 g/L de  $K_2HPO_4$ ; 0,001 g/L de  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ ; 0,001 g/L de  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  e 0,001 g/L de  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  em pH 6.8. Os frascos foram incubados em agitador orbital a 200 rpm, 28 °C por 24 horas. O volume total do pré-inóculo foi transferido para o biorreator TEC-BIO-PLUS (TECNAL) 2000 mL, contendo 900 mL de meio de produção com composição similar ao meio utilizado para o pré-inóculo, modificado apenas pela variação da concentração do glicerol (5, 10 e 15 g/L). As condições utilizadas para produção do AC variaram de acordo com o planejamento fatorial  $2^3$ , como descrito na Tabela 1, sendo mantidas fixas as condições de aeração 0,5 vvm e pH 6,0.

Após 120 horas de cultivo, foram retiradas as amostras e o líquido fermentado foi centrifugado a  $5.500 \times g$  por 20 min a 4°C e o sobrenadante utilizado para a dosagem de AC. Após os experimentos foram realizadas as análises estatísticas dos resultados, com o auxílio do software Statistica 8.0 (Statsoft Inc, 2008).

**Tabela 1.** Níveis dos fatores utilizados no planejamento fatorial  $2^3$

Variáveis	Inferior (-1)	Níveis Central (0)	Superior (+1)
(1) Agitação (rpm)	200	500	800
(2) Temperatura (°C)	15	20	25
(3) Concentração de glicerol (g.L <sup>-1</sup> )	5	10	15

## 2.4 Dosagem do ácido clavulânico

A dosagem de AC foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Bird et al. (1983) através da dosagem espectrofotométrica do AC que é quantificada pela medição do aumento da densidade ótica a 311 nm através da formação do produto 8-hidroxi-6-oxo-4-azooct-2-enol decorrente de sua reação com imidazol. Soluções-padrão de diferentes concentrações de clavulanato de potássio foram utilizadas para determinar a concentração de AC nas amostras.

## 2.5 Dosagem do glicerol residual

Um método colorimétrico descrito por Hae Bok e Demain (1977), foi utilizado para a determinação de glicerol residual no caldo fermentado. O método baseia-se na oxidação do periodato a alditóis para produzir formaldeído. A curva de calibração linear de glicerol foi obtida no intervalo de 0-25  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

## 2.6 Determinação da concentração celular

A concentração celular foi determinada por intermédio do peso da massa celular seca, de acordo com o método descrito por Olsson e Nielsen (1997).

## 3.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

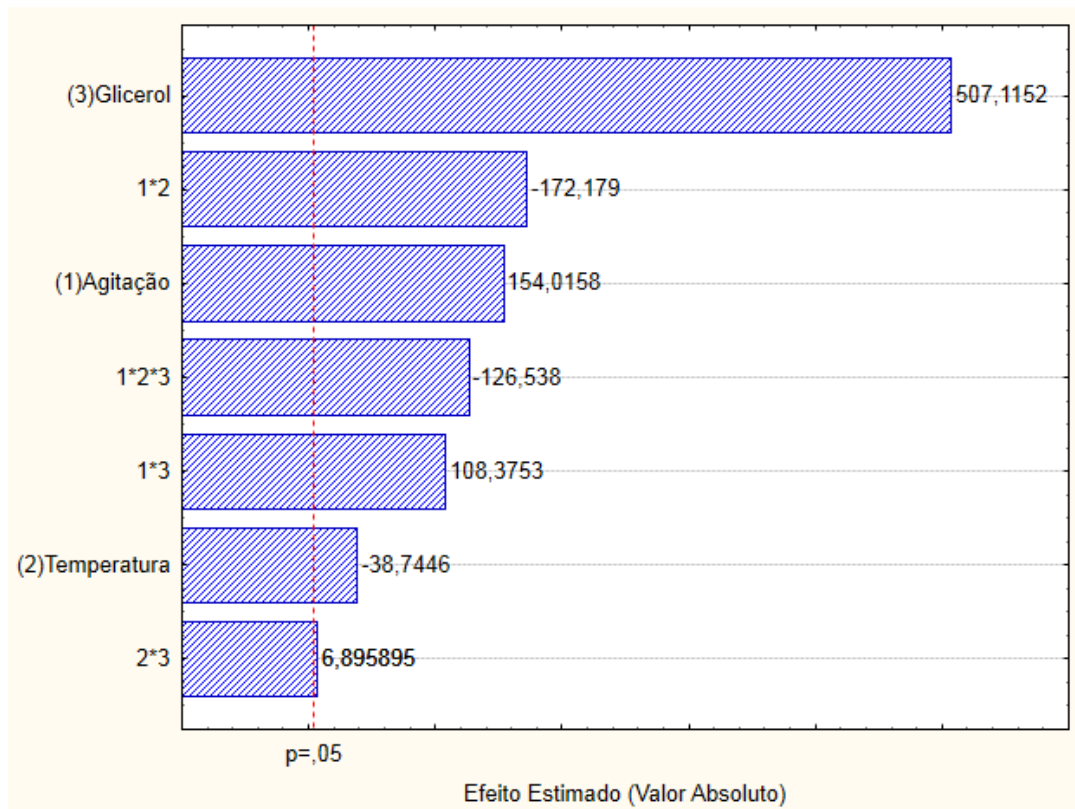
A produção de ácido clavulânico em biorreator tipo tanque agitado por *S. malasyensis* sp. DPUA 1571 foi realizada em diferentes condições de acordo com o planejamento fatorial completo. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 2. A influência das variáveis independentes, agitação (200, 500 e 800 rpm), temperatura (15, 20 e 25 °C) de glicerol (5, 10 e 15  $\text{g.L}^{-1}$ ), sob a produção do AC foi avaliada. A maior concentração de AC foi de 2241,38  $\text{mg.L}^{-1}$  e a maior produtividade de 18,67  $\text{mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  foram obtidas no ensaio com maior agitação (800 rpm), menor temperatura (15 °C) de glicerol (15  $\text{g.L}^{-1}$ ).

Tabela 2. Resultados do planejamento fatorial  $2^3$  para a produção de ácido clavulânico por *Streptomyces malasyensis* DPUA 1571 após 120 horas de cultivo.

Ensaio	Agitação (rpm)	Temperatura (°C)	Glicerol (g.L <sup>-1</sup> )	AC (mg.L <sup>-1</sup> )	P <sub>AC</sub> (mg.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	Glicerol Residual (%)
1	200	15	5,0	0,00	0,00	72,0
2	800	15	5,0	247,57	2,06	72,0
3	200	25	5,0	0,00	0,00	60,0
4	800	25	5,0	0,00	0,00	48,0
5	200	15	15,0	719,56	5,99	49,4
6	800	15	15,0	2241,38	18,67	16,7
7	200	25	15,0	1443,35	12,02	66,0
8	800	25	15,0	1344,82	11,20	23,4
9 (C)	500	20	10,0	181,04	1,50	88,0
10 (C)	500	20	10,0	174,39	1,45	94,0
11 (C)	500	20	10,0	174,39	1,45	72,0

AC- ácido clavulânico; P<sub>AC</sub> – Produtividade de ácido clavulânico

Após análise estatística dos resultados foi possível observar a influência das variáveis independentes: agitação (1), temperatura (2) e concentração de glicerol (3), e suas interações, como pode ser observado na Figura 1.



**Figura 1** - Gráfico de Pareto da influência das variáveis agitação (1), temperatura (2) e concentração de glicerol (3) e suas interações na produção de AC por *Streptomyces malasyensis* DPUA 1571 em biorreator.

A concentração de glicerol (3) foi a variável independente que mais influenciou a produção do AC, como pode ser observado na Figura 1, tendo um efeito positivo sob a produção, ou seja, quanto maior a concentração do glicerol no meio de cultivo maior foi a produção de AC por este micro-organismo. O glicerol é reportado na literatura como a principal fonte de carbono para a produção de AC por *Streptomyces clavuligerus*, na ausência de glicerol este micro-organismo produz outro antibiótico a cefamicina C ao invés do AC (Saudagar *et al.*, 2007). Romero *et al.* (1984) estudaram a biossíntese do AC por *Streptomyces clavuligerus* e sugeriram que o glicerol utilizado no meio de cultivo é convertido em gliceraldeído-3P e utilizado como precursor do carbono C3 da molécula do AC. A elevada produção de AC

(2241,0 mg/L) por *S. malasyensis* DPUA 1571 no ensaio com maior concentração de glicerol (15 g/L) indica que esta fonte de carbono também foi utilizada por este micro-organismo para a produção de AC.

A determinação do glicerol residual presente nas amostras demonstrou que o consumo de glicerol foi maior no ensaio 6, chegando a 83,3% (Figura 2) este consumo associado com uma elevada produção de AC (2241,0 mg/L) por *S. malasyensis* sp. DPUA 1571 no ensaio com maior concentração de glicerol (15 g/L) sugere que esta fonte de carbono também foi utilizada por este micro-organismo para a produção de AC.

Baptista-Neto et al. (2005) comparam três formas de produção de AC por *Streptomyces clavuligerus* em biorreator, processo contínuo sem reciclo celular, processo contínuo com reciclo celular e processo descontínuo (batelada). Estes autores observaram uma maior concentração de AC (475 mg/L) foi obtida no cultivo em batelada, entretanto, maiores valores de produtividade de AC ( $11,7 \text{ mg/L.h}^{-1}$ ) foi no cultivo contínuo. Com estes resultados os autores concluíram que o cultivo da cultura com a reciclagem de células foi o melhor modo de operação para produzir ácido clavulânico de *S. clavuligerus*. Estes autores também observaram que no cultivo em batelada a maior produção de AC ocorreu após total esgotamento do glicerol presente no meio de cultivo.

Costa e Badino (2012) avaliaram a produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus* em batelada com e sem pulsos de glicerol, sob diferentes condições de temperatura (20, 25 e 30°C). Nos ensaios onde as temperaturas foram mantidas estáveis e onde variaram apenas os pulsos de glicerol (1, 2, 3 ou 4), os autores observaram que em geral, a produção de AC aumentou com o aumento do número de pulsos de glicerol, este fato indica que a *S. clavuligerus* pode utilizar continuamente glicerol para a biossíntese de CA.



Como pode ser visualizado na Figura 1, a agitação (1) apresentou efeito positivo sob a produção do AC, em uma maior agitação ocorre melhor distribuição do oxigênio dissolvido para as células, fato que favoreceu a produção do AC.

Viana et al. (2009) estudaram a influência de diferentes variáveis sob a produção de AC por *Streptomyces* sp. DAUFPE 3060, estes autores obtiveram as melhores condições de produção de AC (494 mg/L) em frascos agitados nas condições de 32°C, pH 6,0, 5 g/L de glicerol e 20 g/L farinha de soja a 150 rpm, após obterem as melhores condições de cultivo foram realizadas fermentações em biorreatores de 3L em condições semelhantes as utilizadas nos cultivos em frascos agitados, a 0.5 vvm e 800 rpm. Nestas condições os autores observaram que a produção de AC (672 mg/L) pelo micro-organismo foi aproximadamente 60% superior do que produção obtida em frascos agitados.

A aeração e a agitação são variáveis importantes para assegurar a taxa de transferência de oxigênio eficaz durante bioprocessos aeróbicos (Viana Marques et al., 2010), estudos sugerem que com o aumento da agitação, também ocorra um aumento no coeficiente de transferência de massa volumétrica ( $k_{LA}$ ). Fato que pode ter favorecido uma maior produção de AC por *S. malaysiensis* DPUA 1571 quando foram utilizadas maiores velocidades de agitação.

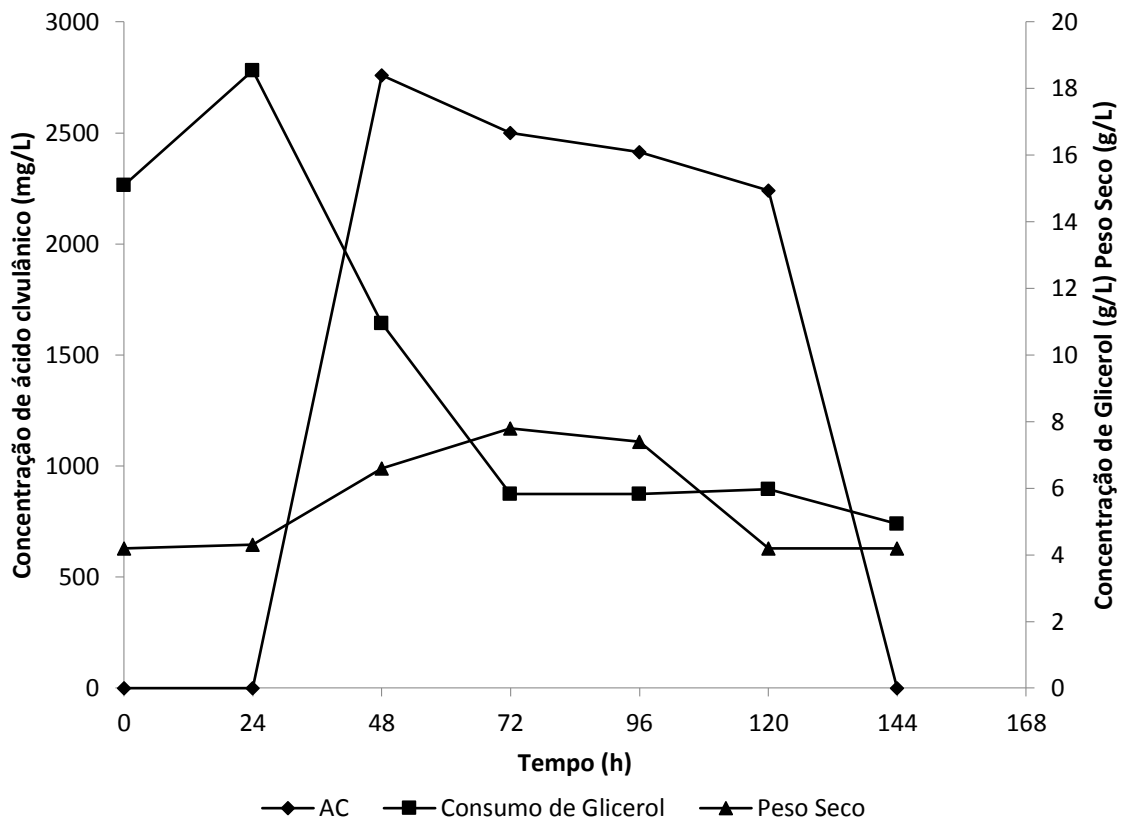
A temperatura (2) apresentou efeito negativo, o que significa que a diminuição da temperatura de produção foi importante para a formação e estabilidade do AC (Figura 1). No presente trabalho o AC foi obtido em maior quantidade no ensaio com temperatura igual a 15 °C. Tradicionalmente o AC é produzido em cultivos com temperatura que variam entre 25 e 30°C (Marques et al., 2011). No entanto, alguns autores já verificaram que uma diminuição na temperatura de cultivo pode elevar a produção do AC, como o observado por Costa e Badino (2012) quando estudaram a produção de AC por *Streptomyces clavuligerus* em batelada alimentada com pulsos de glicerol sob diferentes temperaturas (20, 25 e 30 °C), tais autores verificaram uma elevada produção de AC a 20°C (1266,2 mg/L), resultados condizentes com

os obtidos neste estudo. Além disso, estudos realizados por Santos et al. (2008) sob a estabilidade “*in vitro*” do AC em diferentes temperaturas (20 – 45 °C) mostraram que o AC apresentou melhor estabilidade a 20 °C.

Como no presente estudo as baixas temperaturas de cultivo favoreceram a produção do AC, e associado ao fato de ocorrer menores índices de degradação de AC a temperaturas baixas (15 a 20 °C) quando comparadas as temperaturas mais elevadas (25 e 30 °C), pode ser responsável pelos altos valores de produção obtidos neste estudo.

A Figura 2 mostra o comportamento do cultivo de *Streptomyces malaysiensis* DPUA 1571 nas condições do melhor ensaio (6), realizado a 800 rpm, 15°C, 15 g/L de glicerol a pH 6,0 em função do tempo. Foi possível observar que a produção do AC teve início nas primeiras 24 horas de fermentação, sendo está a maior concentração obtida (2758,62 mg/L) e se manteve praticamente constante até as 120 horas do cultivo. A produção de AC por *Streptomyces clavuligerus* em geral ocorre mais tardiamente após as 72 horas de cultivo (Ortiz et al., 2007; Saudagar e Singhal, 2006; Maranesi et al., 2005). Entretanto, Viana et al., (2009) estudaram a produção de AC por *Streptomyces* sp. DAUFPE 3060 e obtiveram maiores valores de produção no tempo de 48 horas resultados que corroboram com os obtidos no presente trabalho.

A alta concentração obtida por um longo período do cultivo pode ter sido obtida devido à baixa temperatura utilizada neste ensaio (15 °C), visto que a degradação do AC é menor em temperatura mais baixas. Desta forma a alta produção de AC pelo micro-organismo combinada com baixas taxas de degradação resultou em maiores concentrações de AC no meio de cultivo.



**Figura 2.** Produção de ácido clavulânico e consumo do glicerol presente no meio de cultivo por *Streptomyces malaysiensis* DPUA 1571 em função do tempo.

#### 4.0 CONCLUSÃO

Neste estudo foi investigada a influência das variáveis para a produção em biorreator de AC por *Streptomyces malaysiensis* DPUA 1571. De acordo com os resultados obtidos foi possível concluir que maiores concentrações da fonte de carbono, o aumento da agitação e a diminuição da temperatura de cultivo favoreceram a produção desta biomolécula. *Streptomyces malaysiensis* DPUA 1571 é uma alternativa viável para a produção de AC, visto que o AC foi produzido em curto período de cultivo e apresentou-se estável nas condições estudadas.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) (número do processo: 555146/2010-3) pelo suporte financeiro.

## REFERENCIAS

Baggaley, Keith H, Allan G Brownb, and Christopher J Schofield. (1997). “Chemistry and Biosynthesis of Clavulanic Acid and Other Clavams.” *Nat. Prod. Rep.* 14: 309–33.

Brown, A. G., Butterworth, D., Cole, M., Hanscomb, G., Hood, J. D., Reading, C., Rolinson, G. N. (1976). “Naturally-occurring B-lactamase Inhibitors with Antibacterial Activity.” *The Journal of Antibiotics* XXIX(6): 5–6.

Cerri, M O, and a C Badino. (2012). “Shear Conditions in Clavulanic Acid Production by *Streptomyces clavuligerus* in Stirred Tank and Airlift Bioreactors.” *Bioprocess and biosystems engineering* 35(6): 977–84. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22271253> (July 8, 2013).

Ortiz, S.C.a., C.O. Hokka, and A.C. Badino. (2007). “Utilization of Soybean Derivatives on Clavulanic Acid Production by *Streptomyces clavuligerus*.” *Enzyme and Microbial Technology* 40(5): 1071–77.

Saudagar, Parag S, Shrikant a Survase, and Rekha S Singhal. (2008). “Clavulanic Acid: a Review.” *Biotechnology advances* 26(4): 335–51.

ANVISA([http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controlere/rede\\_rm/cursos/rm\\_controlere/opas\\_web/modulo3/mec\\_enzimatico.htm](http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controlere/rede_rm/cursos/rm_controlere/opas_web/modulo3/mec_enzimatico.htm)).

Guimarães D. O., Momesso L. S., Pupo M. T. (2010) Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. *Quim. Nova*, (33) 3, 667-679.

Saudagar P. S., Singhal R. S. (2007) Optimization of nutritional requirements and feeding strategies for clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus*. *Bioresource Technology* 98, 2010–2017.

STATSOFT, I. Statistica, version 8.0. ,2008.

Bird, A. E., Bellis, J. M., Gasson, B. C. (1982) Spectrophotometric Assay of Clavulanic Acid by Reaction with Imidazole. *Analyst*, 107 1241-1245.

Olsson, L., Nielsen, J., (1997) On-line and in situ monitoring of biomass in submerged cultivations. *TIBTECH*, 15 517–522.

Saudagar P. S., Singhal R. S. (2007) Optimization of nutritional requirements and feeding strategies for clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus*. *Bioresource Technology* 98, 2010–2017.

Viana Marques D. A., Carneiro Cunha M. N., Araújo J. M., Lima-Filho J. L., Converti A., Pessoa-JR A., Porto A. L. F. (2011) Optimization of clavulanic acid production by *Streptomyces DAUFPE 3060* by response surface methodology. *Brazilian Journal of Microbiology*. 42,658-667.

Viana Marques D. A., Pessoa-Júnior A., Lima-Filho J. L., Converti A., Perego P., Porto A. L. F. (2010) Extractive Fermentation of Clavulanic Acid by *Streptomyces DAUFPE 3060* Using Aqueous Two-Phase System. DOI 10.1002/btpr.526 Published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

Viana Marques, D. A., Oliveira, R. P. S., Perego, P., Porto, A. L. F., Converti, A. (2009) Kinetic and thermodynamic investigation on clavulanic acid formation and degradation during glycerol fermentation by *Streptomyces* DAUFPE 3060, *Enzyme Microb Technol.* 45, 169-173.

## CONCLUSÕES

- ✓ A estabilidade do ácido clavulânico comercial em soluções de PEG e citrato em diferentes pH foi avaliada e verificou-se uma maior estabilidade desta biomolécula a pH de 6 em PEG com uma massa molar de 20.000 g/mol e concentração de citrato a 5%.
- ✓ O Sistema de Duas Fases Aquosas (SDFA) formados por PEG/citrato foi capaz de extrair e pré-purificar o ácido clavulânico comercial, e as variáveis que influenciaram no processo foram identificadas. Em sistema com concentração de PEG e citrato de 30% e 15%, respectivamente, foram obtidos valores de coeficiente de partição de 3,4 e rendimentos próximos a 100%.
- ✓ *Streptomyces malaysiensis* DPUA 1571 foi capaz de produzir ácido clavulânico por fermentação convencional, sendo obtidas concentrações de 387.66 mg/L de ácido clavulânico após 72 horas de cultivo.
- ✓ *Streptomyces malaysiensis* DPUA 1571 foi capaz de produzir ácido clavulânico por fermentação extrativa utilizando SDFA formados por PEG/citrato. A melhor condição para a produção do ácido clavulânico foi obtida no ensaio formado por PEG com massa molar de 1.000 g/mol a 15% e com concentração de citrato de 15%. Nestas condições foram obtidos valores de coeficiente de partição de 1,6 e rendimentos de até 98,2%.
- ✓ Na produção de ácido clavulânico em biorreator por *Streptomyces malaysiensis* DPUA 1571 foram obtidos altas concentrações de ácido clavulânico (2241,38 mg/L) após 120 horas de cultivo, nas condições de 800 rpm de rotação, 15 °C e concentração de glicerol de 15 g/L.
- ✓ Os resultados apresentados permitem concluir que *Streptomyces malaysiensis* DPUA 1571 pode ser utilizado para a produção de ácido clavulânico, e que a fermentação

extrativa utilizando SDFA é um processos viável para a produção e extração simultânea deste composto, podendo ser utilizada pela indústria farmacêutica.



## **PERSPECTIVAS FUTURAS:**

- ✓ Estudos posteriores visando identificar a molécula do ácido clavulânico presente no caldo fermentado por *Streptomyces malaysiensis* DPUA 1571 através da técnica de HPLC.
- ✓ Verificar a produção do ácido clavulânico em biorreator utilizando a fermentação extrativa.
- ✓ Re-extrair o ácido clavulânico presente no PEG por técnicas de filtração ou cromatografia visando aumentar o grau de pureza do composto produzido por *Streptomyces malaysiensis* DPUA 1571.

## **PRODUÇÕES CIENTÍFICAS**

### **ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO EM PERIÓDICO:**

- **Stability of Clavulanic Acid In Peg/Citrate And Liquid-Liquid Extraction In Aqueous Two-Phase System**

Autores: M.N. Carneiro-da-Cunha, K.P.S. Souza, A.M.O. Mota, J.A. Teixeira, C.S. Porto, T.S. Porto, A.L.F. Porto.

Periódico: Fluid Phase Equilibria

### **DISSERTAÇÃO DE MESTRADO:**

- **Produção e extração de Ácido clavulânico por *Streptomyces* sp. DPUA 1542 isolado de líquens da Região Amazônica em fermentação extrativa por sistema de duas fases aquosas PEG/fosfato.**

Aluna: Vanessa Régia Francisco Couto.

Universidade Federal de Pernambuco – Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas

### **MONOGRAFIA:**

- **Extração de Ácido Clavulânico por Sistema de Duas Fases Aquosas (PEG/citrato).**

Aluna: késsia Porfírio da Silva Souza.

Universidade Federal Rural de Pernambuco

### **PROJETO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA:**

- **Produção e extração de ácido clavulânico por *Nocardia* sp. DPUA 1571 utilizando fermentação extrativa.**

Aluna: Thaís Alves Tineé

Universidade Federal Rural de Pernambuco

**TRABALHOS PUBLICADOS EM CONGRESSOS:**

- **Influência de Diferentes Meios de Cultura na Produção de Pigmentos por Actinomicetos Isolados de Líquens da Região Amazônica.**

Autores: Carneiro da Cunha, M. N.; Couto, V. R. F.; Teixeira, M. F. C.; Araújo, J. M.; Porto, C. S.; Porto, T. S., Porto, A. L. F.

Congresso: XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos - SINAFERM, 2011, Caxias do Sul.  
XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos - SINAFERM 2011, 2011.

- **Fermentação em biorreator de *Nocardia* sp. DPUA 1571 para obtenção de Ácido Clavulânico.**

Autores: Carneiro da Cunha, M. N.; SOUZA, K. P. S.; Porto, C. S.; PORTO, T. S.; Porto, A. L. F.

Congresso: XXI ALAM - Congresso Latinoamericano de Microbiologia, 2012, Santos.

- **Seleção da fonte de nitrogênio para produção de ácido clavulânico por actinobactérias isoladas de líquens da região Amazônica**

Autores: Carneiro da Cunha, M. N.; Couto, V. R. F.; Souza, K. P. S.; Porto, C. S.; Porto, T. S.; Porto, A. L. F.

Congresso: XXI ALAM - Congresso Latinoamericano de Microbiologia, 2012, Santos.

## ANEXO I